

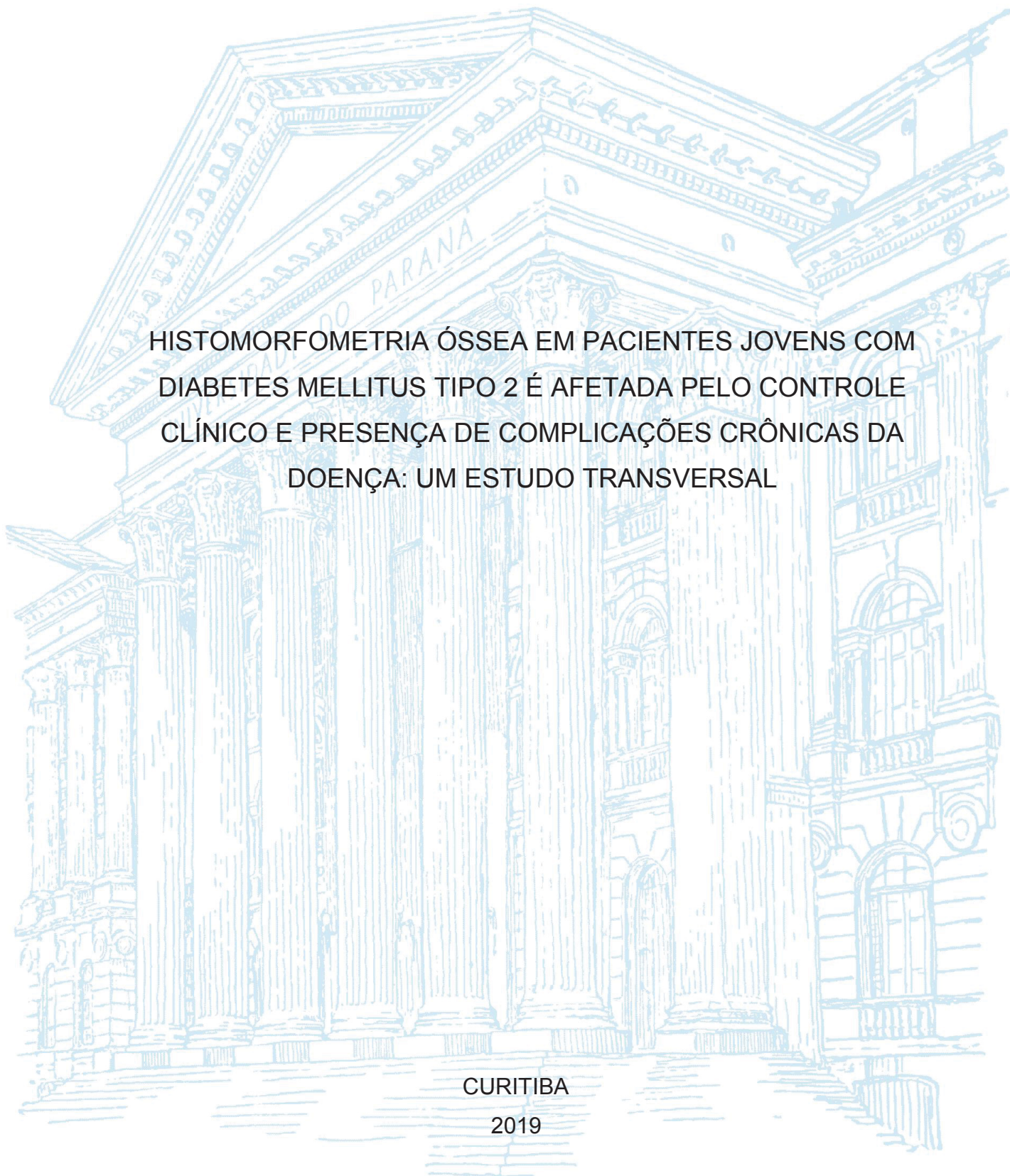
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE

HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA EM PACIENTES JOVENS COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 É AFETADA PELO CONTROLE
CLÍNICO E PRESENÇA DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DA
DOENÇA: UM ESTUDO TRANSVERSAL

CURITIBA

2019



VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE

HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA EM PACIENTES JOVENS COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 É AFETADA PELO CONTROLE
CLÍNICO E PRESENÇA DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DA
DOENÇA: UM ESTUDO TRANSVERSAL

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina
Interna.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Aguiar Moreira.

Coorientadora: Profa. Dra. Victória Z. C. Borba.

CURITIBA

2019

A553 Andrade, Vicente Florentino Castaldo

Histomorfometria óssea em pacientes jovens com diabetes mellitus tipo 2 é afetada pelo controle clínico e presença de complicações crônicas da doença : um estudo transversal [recurso eletrônico] / Vicente Florentino Castaldo Andrade. – Curitiba, 2019.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Aguiar Moreira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Victória Z. C. Borba

1. Doenças ósseas. 2. Fraturas da coluna vertebral. 3. Diabetes mellitus tipo 2. I. Moreira, Carolina Aguiar. II. Borba, Victória Z. C. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WE 225

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE** intitulada: **HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA EM PACIENTES JOVENS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 É AFETADA PELO CONTROLE CLÍNICO E PRESENÇA DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DA DOENÇA: UM ESTUDO TRANSVERSAL**, sob orientação da Profa. Dra. CAROLINA AGUIAR MOREIRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua _____ no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Novembro de 2019.

CAROLINA AGUIAR MOREIRA
Presidente da Banca Examinadora

MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD
Avaliador Externo (FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS -UNICAMP)

FRANCISCO JOSÉ ALBUQUERQUE DE PAULA
Avaliador Externo (FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

FELLYPE DE CARVALHO BARRETO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CÉSAR LUIZ BOGUSZEWSKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Ao Dr. Galdino e dona Dylma, pelo milagre da vida e por todos os sacrifícios empenhados na minha formação; aos meus irmãos, Gal e Marco, pelos risos da nossa eterna infância; à minha família, tronco generoso de amor e aconchego; às amigas e professoras, Carol e Vic, mães de todo estímulo; à dona Belzinha, Luiz Vicente e Vitinho, sentido final da minha existência.

AGRADECIMENTOS

À minha grande amiga e orientadora, Carolina Aguiar Moreira: quando todas as portas pareciam fechadas, uma se abriu! Obrigado pela oportunidade e por me guiar, com sua meiguice e carinho, por essa etapa tão especial da minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, Dra. Victória Z.C. Borba, pelo apoio, estímulo, sugestões e ideias.

Ao Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR (SEMPR), a quem devo muito da minha formação como médico e como ser humano.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna (PPGMI) da UFPR particularmente à professora Iara J. M. Reason, por todas as sugestões.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PRPPG) da UFPR e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização dos recursos para compra dos kits para as dosagens séricas usadas no estudo.

Aos residentes da especialidade de Endocrinologia e Metabologia, pelo encaminhamento dos pacientes em condições de serem enquadrados no estudo.

À Fundação Pro-Renal pela parceria e apoio no preparo das biópsias ósseas.

À bibliotecária Fabiane Führ pelo auxílio com a formatação deste trabalho.

E, em especial, agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar desse estudo. Muitos superaram limitações de toda ordem para torná-lo possível e isso precisa ser reconhecido. Muito obrigado!

“Tudo é possível, menos o impossível. Mas, não sabendo que era impossível, ele foi lá, e fez.” (parafraseando Jean Cocteau, 1869-1963.)

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está associado a um risco aumentado de fraturas. Pouco se sabe sobre as alterações na histomorfometria óssea (HO) em mulheres jovens com DM2. Nenhum estudo avaliou a correlação dos parâmetros de HO com controle glicêmico, presença de complicações crônicas (CCs) e fraturas vertebrais (FVs) nesta população. O objetivo do presente estudo foi avaliar a HO em mulheres na pré-menopausa com DM2, correlacionando-a com controle glicêmico, presença de CCs e de FVs, níveis séricos de pentosidina (PEN) e IGF-1, densidade mineral óssea (DMO) e outros parâmetros clínicos e bioquímicos relacionados ao metabolismo ósseo. Este foi um estudo transversal realizado em um centro médico terciário. A média de idade e IMC foram $41,6 \pm 4,6$ anos e $32,4 \pm 3,9$ Kg/m², respectivamente. Vinte e seis mulheres na pré-menopausa com DM2 submetidas a biópsia óssea foram divididas em grupos com HbA1c < 7% (Bom controle, BC, n = 10) e HbA1c > 7% (Mal controle, MC, n = 16), e subdivididas em grupos com (n = 9) e sem (n = 17) CCs, e com FV (n = 3) e sem FV (n = 23). A prevalência de FV foi de 11,5% das mulheres com DM2 (3/26). Os grupos e subgrupos foram comparados entre si, com um grupo controle histórico (GC, n = 15) para parâmetros de HO, e com um grupo controle saudável (CS) para os grupos com e sem FVs. Os parâmetros da HO (volume ósseo [BV/TV], espessura trabecular [Tb.Th], número de trabéculas [Tb.N], separação entre as trabéculas [Tb.Sp], espessura osteoide [O.Th], superfície osteoide [OS/BS]), superfície de mineralização [MS/BS], taxa de formação óssea [BFR]), taxa de aposição mineral [MAR]), bem como DMO, PEN e IGF-1 foram medidos. A comparação da HO entre os grupos BC e MC com o GC mostrou que o BV/TV estava aumentado nos grupos BC (P < 0,001) e MC (P = 0,05) e O.Th estava reduzida no grupo MC (P = 0,03), mas não no BC (P = 0,53). A comparação dos grupos com e sem CC com o GC mostrou no grupo com CC, O.Th reduzida (P = 0,01) e BV/TV semelhante ao GC (P = 0,11). A comparação entre os grupos com e sem FV mostrou O.Th e OS/BS reduzidos no grupo com FV (ambos, P = 0,04). A comparação entre os grupos com e sem FV com GC mostrou O.Th e OS/BS reduzidos no grupo com FV (P = 0,04 e P = 0,03, respectivamente) e BV/TV e Tb.N aumentados apenas no grupo sem FV (P = 0,02 e P = 0,01, respectivamente); na comparação com CS, PEN e DMO do colo do fêmur e fêmur total foram maiores nas mulheres com DM2 (todos P < 0,05). A HbA1c correlacionou-se negativamente com O.Th (P = 0,02) e OS/BS (P = 0,01). Nenhuma correlação de HO com PEN e IGF-1, mas foi observada uma correlação positiva entre PEN e DMO de coluna L1-L4 (P = 0,03), Z-score de coluna L1-L4 (P = 0,001) e Z-score de colo femoral (P = 0,007). Concluimos que o tecido ósseo em mulheres jovens com DM2 é afetado pelo controle da doença e presença de CCs. A doença óssea no DM2 parece evoluir num *continuum* em que o desfecho mais grave é caracterizado por função osteoblástica e taxa de formação óssea reduzidas, além de redução do volume ósseo nos pacientes com FVs, cuja prevalência foi de 11,5%. PEN pode ter influência na redução da função osteoblástica e na elevação da DMO. Todas estas alterações contribuem para um aumento do risco de fraturas que é subestimado pela DMO nesta população.

Palavras-chave: Doença óssea do diabetes mellitus tipo 2, histomorfometria óssea, fraturas vertebrais, qualidade óssea, pentosidina.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with an increased risk of fractures. Little is known about changes in bone histomorphometry (BH) in young women with T2DM. No study has evaluated the correlation of BH parameters with glycemic control (HbA1c), presence of chronic complications (CCs) and vertebral fractures (VFs) in this population. The aim of the present study was to evaluate BH in premenopausal women with T2DM, correlating it with HbA1c, presence of CCs, and VFs, serum pentosidine (PEN) and IGF-1 levels, bone mineral density (BMD) and other clinical and biochemical parameters related to bone metabolism. This was a cross-sectional study conducted at a tertiary medical center. The mean age and BMI were 41.6 ± 4.6 years and 32.4 ± 3.9 kg / m², respectively. Twenty-six premenopausal women with T2DM who underwent bone biopsy were divided into groups with HbA1c <7% (GC, n = 10) and HbA1c > 7% (PC, n = 16), and subdivided into groups with (n = 9) and without (n = 17) CCs, and with (n = 3) and without VF (n = 23). The prevalence of VF was 11.5% of women with T2DM (3/26). The groups and subgroups were compared with a historical control group (CG, n = 15) for BH parameters, and with a healthy control group (HC) only for the groups with and without VFs. The parameters of BH (bone volume [BV/TV], trabecular thickness [Tb.Th], number of trabeculae [Tb.N], separation between trabeculae [Tb.Sp], osteoid thickness [O.Th], osteoid surface [OS/BS], mineralization surface [MS/BS], bone formation rate [BFR]), mineral apposition rate [MAR]) as well as BMD, PEN and IGF-1 were measured. Comparison of BH between GC and PC groups with CG showed that BV/TV was increased in GC (P <0.001) and PC (P = 0.05) and O.Th was reduced in PC (P = 0.03), but not in the GC (P = 0.53). Comparison of the groups with and without CC with the CG showed in the group with CCs reduced O.Th (P = 0.01) and BV/TV similar to the CG (P = 0.11). Comparison between the with and without VF groups showed reduced O.Th and OS/BS in the VF group (both, P = 0.04). Comparison between groups with and without VF with CG showed reduced O.Th and OS/BS in the with VF group (P = 0.04 and P = 0.03, respectively) and increased BV/TV and Tb.N only in the without VF group (P = 0.02 and P = 0.01, respectively). Comparing with HC, PEN and BMD of the femur neck and total femur were higher in women with DM2 (all P <0.05). HbA1c correlated negatively with O.Th (P = 0.02) and OS/BS (P = 0.01). No correlation of BH with PEN and IGF-1, but a positive correlation was observed between PEN and L1-L4 column BMD (P = 0.03), L1-L4 column Z-score (P = 0.001) and Z-score femoral neck (P = 0.007). We conclude that bone tissue in young women with T2DM is affected by disease control and presence of CCs. Bone disease in T2DM seems to be a continuum in which the most severe outcome is characterized by reduced osteoblastic function and bone formation rate, as well as reduced bone volume in patients with VF, whose prevalence was 11.5%. PEN may influence the reduction of osteoblastic function and elevation of the BMD. All of these changes contribute to an increased risk of fractures that is underestimated by BMD in this population.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, bone disease, bone histomorphometry, vertebral fractures, bone quality, pentosidine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS	11
1.1.1	Objetivo geral	11
1.1.2	Objetivos específicos.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	28
3.1	DESENHO	28
3.2	PACIENTES	28
3.3	CONTROLES DE EXAMES	30
3.4	CONTROLES DA HISTOMORFOMETRIA.....	30
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	31
3.5.1	Densitometria óssea	31
3.5.2	Métodos analíticos laboratoriais	31
3.5.3	Avaliação das complicações crônicas microvasculares.....	32
3.5.4	Exames Radiológicos	33
3.5.5	Biópsia óssea transilíaca	33
3.5.6	Preparação do material da biópsia óssea e avaliação.....	34
3.5.7	Histomorfometria óssea	35
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	37
4.1	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	37
4.1.1	PRIMEIRO ARTIGO	38
4.1.2	SEGUNDO ARTIGO.....	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE 1 – REGISTRO DA SUBMISSÃO DO PRIMEIRO ARTIGO À REVISTA THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM.....	85
	APÊNDICE 2 – REGISTRO DA SUBMISSÃO DO SEGUNDO ARTIGO À REVISTA OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL	87

APÊNDICE 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR.....	88
APÊNDICE 4 – MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) USADO NO ESTUDO.....	92

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) caracteriza-se pela hiperglicemia resultante da incapacidade absoluta (DM tipo 1) ou relativa (DM tipo 2) do organismo na produção e ação da insulina (ARMAS et al., 2012). Na população adulta (20-79 anos), a prevalência global do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) era 8,8% (425 milhões de pessoas) em 2017, devendo saltar para 9,9% em 2045 (628 milhões de pessoas) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Segundo essa entidade, 4 milhões de pessoas na citada faixa etária morreram em 2017 de complicações relacionadas ao DM como um todo, o que corresponde a 10,7% da mortalidade global por todas as causas entre as pessoas deste grupo etário, e os gastos globais com o tratamento desta doença e suas complicações deverão saltar de US\$ 727 bilhões em 2017 para US\$ 776 bilhões em 2045. Ainda, estima-se que 30-50% dos pacientes com DM2 sigam não diagnosticados e sujeitos ao desenvolvimento de complicações crônicas (CCs) da doença.

A hiperglicemia crônica pode levar a várias CCs, tanto microvasculares (afetando retina, nervos, rins e outros tecidos) como macrovasculares (resultando em doença arterial coronariana, doença arterial periférica e doença cerebrovascular) (ARMAS et al., 2012). Alguns estudos tem demonstrado um risco aumentado de fraturas em pacientes com DM sugerindo que a fragilidade óssea seja mais uma complicação crônica (BONDS et al., 2006; JANGHORBANI et al., 2007; MIAO et al., 2005; VESTERGAARD, 2007).

A osteoporose é caracterizada clinicamente por reduzida resistência óssea e por um risco aumentado de fraturas de baixo impacto que aumenta dramaticamente com idade (VAN STAA et al., 2001). A osteoporose pode ser primária, devido ao processo de envelhecimento e às alterações hormonais da menopausa ou secundária, causada por uma doença ou medicação que afetam o metabolismo ósseo. As fraturas por fragilidade são o indicador mais forte do risco de fraturas futuras. Pacientes que tiveram uma fratura em qualquer sítio tem o dobro de chance de ter uma nova fratura no futuro do que pessoas que nunca tiveram tais lesões; pacientes que tiveram uma fratura de baixo trauma, ou seja, clinicamente osteoporótica, de punho, quadril, úmero proximal ou tornozelo, apresentam um risco de fratura quase quatro vezes maior; já a maioria dos pacientes que sofreram

fraturas vertebrais sofrerão novas fraturas vertebrais nos próximos 3 anos (STOLNICKI; OLIVEIRA, 2016).

DM e Osteoporose são doenças de prevalência crescente com o envelhecimento da população e de morbidade e mortalidade significativa. As relações entre elas são complexas e permanecem controversas, apesar de já extensamente estudadas. A tendência de maior expectativa de vida e um estilo de vida caracterizado por baixa atividade física e maior ingestão de alimentos altamente calóricos contribuem para o aumento da incidência de DM e osteoporose (HOFBAUER et al., 2007).

Na prática clínica o principal método usado para avaliação do risco de fratura é a medida da densidade mineral óssea (DMO) pela absorciometria por dupla emissão de raios-X (*dual energy X-ray absorptiometry* – DXA). Há dados consistentes na literatura demonstrando que a densidade mineral óssea (DMO) está reduzida no DM1 (VESTERGAARD, 2007). Em contraste, com relação ao DM2, observa-se o oposto. Vários estudos mostram que a DMO em pacientes DM2 é aumentada quando comparada a não diabéticos (MA et al., 2012). Para uma dada DMO, pacientes DM2 tem risco de fratura aumentado comparados a não diabéticos (SCHWARTZ et al., 2012).

Assim, há um paradoxo na relação DM2 vs. DMO: o risco aumentado de fraturas persiste a despeito de uma DMO normal ou mais alta do que na população geral não diabética (MA et al., 2012), sugerindo que há uma alteração na qualidade óssea nesses pacientes. Contudo, os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ainda permanecem desconhecidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros estruturais e da remodelação óssea pela técnica da histomorfometria óssea (HO) em um grupo de mulheres na pré-menopausa com DM2 sob tratamento com hipoglicemiantes orais e/ou insulina, comparando um grupo metabolicamente bem controlado (hemoglobina glicada, HbA1c < 7 %) com um grupo mal controlado (HbA1c > 7 %), e cada grupo a um grupo controle histórico da HO.

1.1.2 Objetivos específicos

Correlacionar os achados da HO com as características clínicas de cada grupo estudado, medidas da DMO, níveis séricos de pentosidina (PEN) e *insulin-like growth factor type 1* (IGF-1).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como a população mundial envelheceu nas últimas três décadas, a incidência de fraturas aumentou significativamente. Em 1990, estima-se que 1,3 milhões de fraturas de quadril ocorreram em todo o mundo, e que a prevalência de portadores de sequelas ou algum grau resultante de deficiência foi de quase 4,5 milhões; até 2010 estima-se que as fraturas de quadril tenham aumentado para 2,7 milhões ao ano (COOPER; FERRARI, 2017). No Brasil, o número total de pessoas acometidas por fraturas por fragilidade chega a 10 milhões e o gasto com tratamento e cuidados desses casos no Sistema Único de Saúde (SUS) somente no ano de 2010 chegou a R\$ 81 milhões; o número de fraturas de quadril que era de cerca de 121.700 casos em 2010, atingirá 160.000 em 2050 (STOLNICKI; OLIVEIRA, 2016).

As fraturas do quadril são particularmente devastadoras: menos da metade dos indivíduos que sobrevivem a uma fratura de quadril vai andar novamente sem ajuda (OSNES et al., 2004) e uma proporção significativa nunca recupera o seu antigo grau de mobilidade (MAGAZINER et al., 1990); um ano após a fratura de quadril, 60% dos pacientes requerem assistência com atividades como alimentação, vestir-se ou ir ao banheiro, e 80% precisa de ajuda com atividades como compras ou dirigir automóvel (COOPER, 1997). Entre 10-20% das pessoas que sofrem tais fraturas se tornarão moradores de casas de assistência um ano após o evento (COOPER; FERRARI, 2017).

2.1 FRATURAS EM PACIENTES COM DM

A consequência clínica mais importante da osteoporose são as fraturas por fragilidade, por se relacionarem com aumento da morbimortalidade. Em particular, as fraturas vertebrais (FVs) afetam negativamente os pacientes de várias maneiras: causam lombalgia crônica, perda de altura, deformidade e imobilidade (LIPS et al., 1999; NEVITT et al., 1998). Da mesma forma, levam à perda de autoestima, imagem corporal distorcida e depressão (GOLD, 2001; SL et al., 2007; TOSTESON et al., 2001), além de gerar impacto negativo significativo na rotina, atividades da vida diária (HALL et al., 1999; KANAZAWA et al., 2018) e na qualidade de vida (KANAZAWA et al., 2018). A sobrevivência também é afetada por FVs e de quadril: após um desses eventos, a mortalidade durante os 5 anos seguintes é

aproximadamente 20% maior do que seria esperado, com a maioria das mortes ocorrendo nos primeiros 6 meses após fratura de quadril (COOPER; FERRARI, 2017). Com relação às chamadas Fraturas não-quadril, não-vertebrais (NHNV - *Non-Hip Non-Vertebral*), que correspondem a aproximadamente dois terços de todas as fraturas por fragilidade, estudos mostram que há repercussão importante das mesmas na qualidade de vida dos pacientes, baseado no indicador HRQL – *health related quality of life* (ROUX et al., 2012), além de aumento da mortalidade (TRAN et al., 2017). Assim, para melhorar a qualidade de vida das pessoas com osteoporose deve-se ter foco nas intervenções para prevenir fraturas e tratar a doença.

Um estudo dinamarquês (HOLM et al., 2018) recentemente publicado avaliou uma coorte histórica de 6.285 mulheres predominantemente na pós-menopausa, entre as quais 229 com DM2, acompanhadas por 5,8 anos em média quanto a ocorrência de fratura osteoporótica maior (fratura de quadril, rádio, úmero e fratura vertebral clínica), e observou a presença de um elevado risco de fratura: fraturas morfométricas vertebrais (prevalentes) (43,7% vs. 33,2%, $p = 0,0010$) e fratura osteoporótica maior (26,2% vs. 20,5%, $p = 0,038$) foram mais comuns em pacientes com DM2. Na análise univariada para associação de DM2 com os diversos tipos de fratura, o *hazard ratio* (HR) foi 1,415 para fratura em geral (IC 95% 1,077 - 1,858, $p = 0,0128$), 1,726 para fratura osteoporótica maior (IC 95% 1,265 - 2,355, $p = 0,0006$), 2,759 para fratura de quadril (IC 95% 1,678 - 4,534, $p < 0,0001$) e 1,883 para fratura de úmero (IC 95% 1,051 - 3,374, $p = 0,333$), não mostrando significância estatística para fraturas de antebraço, fratura lombar e outras fraturas. Na análise multivariada, porém, corrigindo-se outros fatores de risco para fratura, houve associação estatisticamente significativa apenas entre DM2 e fratura osteoporótica maior (HR: 1,533; IC 95% 1,053 - 2,232, $p = 0,0260$) e DM2 e fratura de quadril (HR: 1,833; IC 95% 1,016 - 3,308, $p = 0,0442$). Os autores concluíram que houve uma associação entre DM2 e risco aumentado de fratura osteoporótica maior, motivada principalmente por um risco aumentado de fratura de quadril, sendo que o achado foi independente da presença de osteoporose.

Fraturas por fragilidade ocorrem por diminuição da resistência óssea, a qual está relacionada com a integração de dois fatores principais: densidade e qualidade óssea. A qualidade óssea refere-se à microarquitetura, remodelação e mineralização óssea (SEEMAN; DELMAS, 2006). Alterações na microarquitetura óssea trabecular,

como diminuição do volume ósseo, redução no número e na espessura das trabéculas e o aumento do espaço entre elas, levam a redução da força e consequente aumento de fraturas. Portanto, a avaliação da microestrutura óssea é um instrumento importante na análise das propriedades mecânicas do osso e, consequentemente, do risco de fraturas por fragilidade (DEMPSTER, 2003).

2.2 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM PACIENTES COM DM

Na prática clínica o principal método usado para avaliação da resistência óssea e risco de fratura é a medida da DMO pela DXA. Usando este método, há dados consistentes na literatura demonstrando que a DMO está reduzida no DM1 (VESTERGAARD, 2007), aumentando o risco teórico calculado de fratura de quadril (1,42) nesta população. Contudo, uma vez que o aumento observado no risco de fratura de quadril nessa população é três vezes maior, essa diferença sugere que outros fatores que não apenas a DMO, ou seja, a qualidade óssea, provavelmente contribuem para o maior risco de fratura no DM1 (RUBIN, 2017).

Em contraste, com relação ao DM2 observa-se o oposto quanto à DMO. Uma metanálise de 15 estudos observacionais mostrou que a DMO em pacientes DM2 é aumentada quando comparada a não diabéticos, com uma diferença de 0,04 g/cm² (95% IC: 0,02 - 0,05) no colo femoral, 0,06 g/cm² (95% IC: 0,04 - 0,08) no quadril, e 0,06 g/cm² (95% IC: 0,04 - 0,07) na coluna (MA et al., 2012). Ademais, para uma dada DMO, comparados a indivíduos sem DM2, pacientes com DM2 tem risco de fratura aumentado (SCHWARTZ et al., 2012). A análise de pacientes de várias coortes longitudinais [SOF, *Osteoporotic Fractures in Man (MrOS)* e *Health ABC*] mostrou que quando uma dada DMO foi usada como preditora de risco de fratura em pacientes com DM2, para o correspondente T-escore o risco de fratura foi deslocado para cima, e, assim, subestimado, o mesmo se dando com um outro método usado para predição de fraturas em DM2, o *fracture risk assesment* (FRAX) (RUBIN, 2017; SCHWARTZ et al., 2012).

2.3 TRABECULAR BONE SCORE – TBS

Um outro método recentemente validado para complementar o FRAX na avaliação do risco de fratura é o *Trabecular Bone Score* (TBS) (MCCLOSKEY et al., 2016). O TBS baseia-se na análise da textura óssea derivada do DXA anteroposterior da coluna lombar, avaliando o grau de heterogeneidade no osso,

sendo um escore inferior (mais heterogêneo) preditivo de fratura (SILVA et al., 2014). EM DM, o TBS é reduzido, a despeito de uma melhor DMO, e prediz fratura melhor que DXA, sugerindo que possa haver um déficit ósseo no DM que é melhor capturado pelo TBS. Isso foi demonstrado numa recente coorte retrospectiva envolvendo 29.407 mulheres de 50 anos ou mais de idade, submetidas a exame de DXA no início do seguimento médio de 4,7 anos, sendo 2.356 portadoras de DM, avaliadas para a incidência de fratura osteoporótica maior no período (LESLIE et al., 2013).

2.4 FATORES DE RISCO PARA FRATURAS EM DM

É importante salientar que o risco aumentado de fraturas observado no DM2 pode estar relacionado à presença de complicações microvasculares do DM e outros fatores inerentes ao tratamento desta condição (IVERS et al., 2001; MELTON et al., 2008; STROTMEYER et al., 2005), frequentemente associada a comorbidades e polifarmácia que podem levar a maior risco de quedas e fraturas observadas nessa população (WALLANDER et al., 2017).

Avaliando esses últimos fatores, uma recente metanálise envolvendo 74 estudos prospectivos avaliou 31 fatores de risco para queda em pacientes com DM2 e idade acima de 65 anos (entre eles fatores sociodemográficos, de mobilidade, sensoriais, psicológicos, médicos e uso de medicamentos), detectando uma *hazard ratio* (HR) = 1,19 (IC 95%: 1,1 - 1,3) para risco de quedas comparada a não diabéticos (DEANDREA et al., 2010). Esse estudo, porém, não avaliou especificamente o uso de insulina como fator de risco, e o HR do DM2 foi considerado moderado (entre 1 - 2) quando comparado com os fatores de risco mais elevados (> 2), como o histórico de queda prévia, problemas de marcha, uso de instrumentos de auxílio para caminhar, vertigem, doença de Parkinson e uso de drogas antiepiléticas.

As quedas, contudo, não explicam completamente o risco de fratura aumentado relacionado ao DM2. Estudos delineados para avaliar a relação entre DM2 e fraturas, mesmo após um ajuste para quedas, mostraram uma associação independente entre DM e fraturas (BONDS et al., 2006; RUBIN, 2017). O uso de insulina poderia ser responsável por uma parte deste risco (LIPSCOMBE et al., 2007; MELTON et al., 2008; SCHWARTZ et al., 2001). Em um relato recente de uma grande coorte de pacientes idosos (idade \pm DP = 80,8 \pm 8,2 anos, N = 429.313) o

risco de quedas foi aumentado em pacientes com DM2 comparado com pacientes não diabéticos, independente do regime de tratamento clínico, mas a fratura de quadril se mostrou aumentada apenas nos usuários de insulina (HR = 1,24, IC 95% 1,16 - 1,32), sugerindo que um mecanismo que afeta a força óssea (uso de insulina significaria doença clínica mais grave requerendo a insulinização ou associada a complicações crônicas do DM), em adição às quedas, podem desempenhar um papel no risco aumentado de fraturas observados nesta população (WALLANDER et al., 2017).

Além da insulinoterapia, o maior tempo de doença (DE LIEFDE et al., 2005; LESLIE et al., 2007) e a presença de complicações crônicas micro e macrovasculares (IVERS et al., 2001; MELTON et al., 2008; STROTMEYER et al., 2005) parecem estar relacionadas ao aumento de fraturas no DM2, bem como o uso de tiazolidinedionas (TZDs), como demonstrou uma metanálise, na qual essas drogas mostraram estar relacionadas à perda óssea e aumento de fraturas, particularmente em mulheres (LOKE; SINGH; FURBERG, 2009).

Em relação ao controle glicêmico como fator de risco de fraturas, o estudo ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*), um estudo randomizado e controlado, incluiu em seu estudo auxiliar (*Accord Bone Study*) 7.287 dos 10.251 participantes do estudo inicial, tanto em seu braço de controle intensivo do DM (HbA1c mediana = 6,4%) como no braço de controle padrão (HbA1c mediana = 7,5%). Após seguimento médio de $3,8 \pm 1,3$ anos, não houve diferença no risco de fratura ou de quedas entre os grupos (SCHWARTZ, 2016), enquanto que estudos observacionais mostraram resultados limitados e inconsistentes (LESLIE et al., 2012; MA et al., 2012; VESTERGAARD, 2007). Recentemente, um estudo mostrou que o mau controle glicêmico tem impacto sobre o risco de fraturas por fragilidade no DM1, mas não no DM2 (JICK et al., 2018), e o uso de um fator de correção derivado dos níveis de HbA1c para o cálculo do FRAX pode aumentar a habilidade desta ferramenta em predizer o risco de fraturas em pacientes com DM2 (VALENTINI et al., 2018).

A evidência de que o risco de fratura é aumentado no DM2, paradoxalmente, apesar de uma DMO normal, tem levado à hipótese de que há alterações específicas nas propriedades esqueléticas que são associadas ao diabetes; essas alterações na qualidade óssea incluem anormalidades nas propriedades materiais,

dinâmicas e na microarquitetura esquelética, que podem contribuir para o risco de fratura aumentado observado no DM2 (LESLIE et al., 2012).

2.5 PRODUTOS AVANÇADOS DE GLICAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA DO COLÁGENO - AGES

Os mecanismos biológicos através dos quais o DM2 atua sobre o osso podem estar relacionados ao acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (*advanced glycation end-products* - AGEs) em diferentes partes deste tecido. Essas substâncias são formadas pela reação de *Maillard*, uma reação não enzimática entre açúcares redutores e grupos aminas livres de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, contribuindo para o envelhecimento das macromoléculas (YAMAGISHI; NAKAMURA, 2015), da qual resultam bases de *Shiff* via adição nucleofílica. Sob condições hiperglicêmicas e/ou de estresse oxidativo, esse processo inicial de formação, ainda reversível, de adictos da *base de Shiff* rearranjam seus grupos “carbonila” intermediários e convertem-se nos chamados *compostos de Amadori*, mais estáveis e ligados covalentemente: as alfa-dicarbonilas ou oxaldeídos, entre os quais o glioxal, o metil-glioxal e a 3-deoxi-glicosona (TAKEUCHI et al., 2001). Após o curso de dias ou semanas, os compostos de *Amadori* sofrem outras reações espontâneas de rearranjo para formar a macromolécula fluorescente, irreversivelmente interligada, chamada AGEs, as quais estima-se que sofram 10% dos *compostos de Amadori* (YAMAGISHI; IMAIZUMI, 2005). AGEs são lentamente degradados e permanecem por longo tempo nos vasos sanguíneos, mesmo após o controle glicêmico ter melhorado (WOLFFENBUTTEL et al., 1996).

Muitos tipos de proteínas ligantes dos AGEs tem sido reportadas. Entre elas o receptor dos AGEs (*receptor of AGE* - RAGE), um receptor celular de superfície, membro da superfamília das imunoglobulinas, transdutor do sinal dessas moléculas, das quais sofrem estímulo de *up-regulation* (super-expressão) (YAMAGISHI; NAKAMURA, 2015).

O principal constituinte orgânico do osso é o colágeno tipo I, formado por dois domínios não-helicoidais e uma região helicoidal tripla. Essa proteína estrutural é composta por três cadeias polipeptídicas com uma sequência muito específica de aminoácidos que permite que as cadeias se enrolem em uma estrutura helicoidal tripla; os aminoácidos que se encontram na superfície da hélice estão envolvidos na formação das ligações cruzadas do colágeno (VASHISHTH, 2009). As interligações

cruzadas do colágeno constituem uma importante modificação pós-translacional do colágeno, e ocorre por dois processos distintos: 1) interligação enzimática, mediada pela lisil-hidroxilase e lisil-oxidase; e 2) interligação não-enzimática, mediada por glicação e/ou oxidação, que afetam diferentemente as propriedades mecânicas e a estabilidade do colágeno (KARIM; BOUXSEIN, 2016).

As interligações enzimáticas requerem uma enzima para criar ligações cruzadas intra ou interfibrilares que resultam na transformação das ligações cruzadas bivalentes em ligações cruzadas trivalentes e estáveis (GARNERO, 2012), e habitualmente aumentam a rigidez da fibrila de colágeno e a força óssea.

As interligações não-enzimáticas, acima citadas de maneira genérica, no osso envolvem uma reação bioquímica entre um grupo amino da lisina ou da hidroxilisina e um grupo aldeído de um açúcar, como a glicose, formando glicosil-lisina, que, por sua vez, passa por uma reação adicional para formar um adicto de base de Schiff ou um composto de Amadori (KARIM; BOUXSEIN, 2016)

Esses produtos intermediários sofrem reações bioquímicas adicionais para eventualmente criar modificações pós-translacionais no colágeno (AGEs), e podem acumular-se em inúmeros tecidos, incluindo tendões, pele, cartilagem e osso (VIGUET-CARRIN et al., 2006). AGEs incluem ligações cruzadas que se formam com ou entre as fibras de colágeno (por exemplo, pentosidina, vesperilisina, crosslina) e modificações não-cruzadas, (por exemplo, carboximetillisina, carboxietil-lisina e pirralina) (BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998).

Proteínas com meias-vidas longas, como o colágeno, têm mais chances para suas cadeias laterais serem glicadas. O colágeno tipo I é considerado um fator determinante principal das propriedades de resistência óssea pois trata-se do principal componente proteico da matriz óssea (YAMAMOTO; SUGIMOTO, 2016). As fibrilas de colágeno são construídas de moléculas de protocólágeno que são conectadas umas às outras através da interligação em sítios geneticamente determinados, por enzimas específicas, tais como a lisina hidroxilase e a lisil oxidase (EYRE, 1984). A interligação cruzada intermolecular enzimática dá mais rigidez ao colágeno aumentando, assim, a resistência do tecido (DEPALLE et al., 2015).

O osso é composto por colágeno tipo 1 endurecido por cristais de hidroxiapatita de cálcio. Um aumento da densidade mineral do tecido aumenta a sua dureza mas sacrifica a sua flexibilidade, sendo que o osso humano normal é 60% mineralizado (SEEMAN; DELMAS, 2006). A composição e o grau de ligações

cruzadas do colágeno também influenciam sua função. A tripla hélice do colágeno tipo I confere força em tensão, enquanto as ligações cruzadas mantêm suas hélices presas. Se há poucas ligações cruzadas, as hélices podem separar-se; se as ligações cruzadas são excessivas, a habilidade para absorver energia diminui (BAILEY et al., 1999; BANSE; SIMS; BAILEY, 2002; GARNERO et al., 2002; VIGUET-CARRIN; GARNERO; DELMAS, 2006).

A PEN é o AGE mais bem estudado. Dois estudos relataram uma associação entre maiores níveis de PEN e o risco de fraturas vertebrais. Para examinar a associação entre os níveis de PEN sérica e FVs em pacientes japoneses portadores de DM2, um estudo transversal analisou 77 homens acima de 50 anos e 76 mulheres na pós-menopausa, comparando dados de DMO, PEN sérica, fração óssea da fosfatase alcalina, e níveis urinários de NTX (*type 1 collagen crosslinked N-telopeptide*), entre pacientes com e sem FVs (YAMAMOTO et al., 2008). Os autores concluíram que em mulheres idosas diabéticas, mas não em homens, ao contrário da DMO, os níveis de PEN podem ser úteis para avaliar o risco de FVs prevalentes e podem refletir a qualidade óssea neste grupo. Um segundo estudo avaliou 432 mulheres idosas japonesas não diabéticas com relação à associação entre os níveis de PEN urinária e a presença de FVs prevalentes e incidentes, durante um período de seguimento de $5,2 \pm 3,3$ anos (SHIRAKI et al., 2008), concluindo que os níveis deste subtipo de AGEs urinário é um marcador para FVs nesta população.

Numa coorte observacional envolvendo 501 pacientes com e 427 pacientes sem DM, homens e mulheres com idade entre 70 - 79 anos, avaliou-se os níveis basais de PEN urinária e sua associação com as FVs incidentes e as FVs prevalentes ao início do seguimento (SCHWARTZ et al., 2009), concluindo que maiores níveis de PEN urinária são um fator de risco da ordem de 42% para a incidência de fraturas em idosos adultos com DM e podem contribuir em parte para reduzida força óssea no DM2.

Já um estudo de coorte japonês (FORMEN) recentemente publicado, envolvendo 2.174 homens idosos (> 65 anos), mostrou que nesta população, aqueles com hiperglicemia tiveram alta DMO e baixo TBS; aqueles com elevada insulino-resistência mostraram baixo TBS, sendo que essas associações não foram explicadas pela redução do *turnover* ósseo ou pela retenção de PEN (IKI et al., 2017)

Os AGEs reduzem as propriedades materiais e biomecânicas do osso, por enrijecer o colágeno e reduzir a força óssea independente da DMO medida pela DXA (RUBIN, 2017). Estudos em ratos mostraram que o acúmulo de AGEs é acelerado pelo DM e correlaciona-se com múltiplas medidas de força óssea (SAITO et al., 2006). Um estudo clínico mediu os AGEs na pele por autofluorescência e encontrou uma correlação inversa desta com a *bone material strenght index* (BMSi) por microindentação de impacto (FURST et al., 2016). Um estudo em cadáveres de 28 mulheres mediu diretamente AGEs no osso, demonstrando que maior conteúdo de AGEs ósseo foi associado com pior resistência óssea (ABRAHAM et al., 2016). Todos esses dados sugerem que acúmulo de AGEs no osso e sua matriz colágena contribui para a observada alteração das propriedades materiais e reduzida força óssea observada neste tecido no DM (RUBIN, 2017).

Apenas dois estudos avaliaram a diferença dos níveis dos AGEs no osso cortical e no osso trabecular em humanos, com resultados discrepantes. Um deles relatou maior conteúdo de PEN no osso cortical do que no osso trabecular, achado que foi atribuído às maiores taxas de *turnover* do osso trabecular, resultando em maior remoção de AGEs (ODETTI et al., 2005). De modo inverso, outro estudo relatou maior concentração de AGEs fluorescente total e PEN no osso trabecular, que foi atribuído à maior relação superfície-volume nesta fração óssea, colaborando, assim, para o maior acesso de açúcar para formação de AGEs (KARIM et al., 2013). Analisando biópsias de crista ilíaca de pacientes com DM1, 5 deles com fratura e 5 sem fraturas, comparando-os com 5 controles saudáveis, um estudos mediu PEN na matriz óssea por HPLC (*high performance liquid chromatography*, cromatografia líquida de alta performance) no osso trabecular e no cortical, além do grau de mineralização óssea (GMO) por microrradiografia e as propriedades mecânicas por testes de micro e nanodureza (FARLAY et al., 2016). Tal estudo mostrou aumento significativo da PEN no osso trabecular dos pacientes com DM1 com fratura em relação aos controles, e foi mais mineralizado que os DM1 sem fratura e os controles; não foi observada diferença entre o conteúdo de PEN no osso trabecular entre os DM1 sem fratura e os controles. Os autores não observaram diferença no osso cortical dos pacientes com DM1 sem fratura e os controles, mas notaram correlação positiva entre HbA1c e PEN e entre HbA1c e o GMO, concluindo que todas essas alterações poderiam levar a um osso menos

flexível por redução do módulo de elasticidade e a uma tendência a fraturas por baixa-energia nesta população. Não há estudos semelhantes em DM2 na literatura.

Os AGEs podem enfraquecer o osso também por reduzir a formação óssea que parece ocorrer no DM: há evidências sugerindo que tais substâncias interferem com o desenvolvimento, função e aderência dos osteoblastos ao colágeno da matriz (LESLIE et al., 2012). Além disso, também a atividade osteoclástica parece estar comprometida. Nesta linha, um estudo transversal avaliou amostras de osso cortical de fêmur de 18 cadáveres masculinos não diabéticos, sendo 6 jovens (31 ± 6 anos), 6 de meia- idade (51 ± 3 anos) e 6 idosos (76 ± 4 anos), quanto ao acúmulo de AGEs e sua correlação com a atividade osteoclástica (medida da área poços de reabsorção) em ósteons mais novos, ósteons mais antigos e no tecido intersticial, mostrando que há aumento dos AGEs com a idade, sendo que tal acúmulo inicia-se no tecido intersticial, seguindo pelos ósteons mais antigos, estando em menor nível nos ósteons mais recentes, interessante iniciando-se nas linhas de cementação e daí difundindo-se para outras partes do tecido ósseo mais velho (DONG et al., 2011). Esses autores observaram também que a atividade osteoclástica teve uma correlação positiva com a concentração de AGEs e tal efeito foi aumentando com o aumento da idade do doador- cadáver.

2.6 REMODELAÇÃO ÓSSEA

Vários estudos sugerem que o DM está associado a um estado de baixo *turnover* ósseo. Uma recente metanálise envolvendo 66 estudos entre 2.881 selecionados para investigar diferenças nos marcadores do *turnover* ósseo entre pacientes diabéticos e controles (HYGUM et al., 2017) mostrou que os níveis séricos dos marcadores de reabsorção óssea (telopeptídeo C-terminal do pró-colágeno tipo 1 [CTX]: - 0,1 ng / mL [- 0,12, -0,08]), e os marcadores de formação óssea (osteocalcina (OC): -2,51/ mL [- 3,01, -2,01]) e propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo 1 (P1NP): - 10.80 ng/ mL [-12,83, - 8,77]) foram todos menores em pacientes com DM comparados com controles. Além disso, a TRAP (fosfatase ácida tartarato-resistente) mostrou-se reduzida em pacientes com DM2 (- 0,31 U/L [- 0,56, - 0,05]) em comparação aos controles. Por outro lado, a esclerostina (ESC) foi significativamente maior em pacientes com DM2 (14,92 pmol/L [3,12; 26,72]) e DM1 (3,24 [1,52, 4,96]) comparados com os controles, enquanto a osteoprotegerina (OP) sérica foi aumentada nos pacientes diabéticos em comparação com controles (2,67

pmol/L [0,21, 5,14]). Todos os achados citados levaram os autores à conclusão de que os marcadores de formação e reabsorção óssea estão diminuídos em pacientes com DM e isso sugere um estado de baixa renovação óssea, que, por sua vez, pode levar a um osso mais frágil.

A descoberta da via sinalizadora Wnt e sua importância na homeostase óssea contribuiu para melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da remodelação óssea (HUANG; HE, 2008). Um dos principais reguladores da via Wnt é o produto do gene *SOST*, a ESC, a qual é expressa quase que exclusivamente pelo osteócito. A ESC é um antagonista que age sobre a massa óssea por ligação competitiva com o LRP-5 (*low-density lipoprotein receptor-related protein-5*) (LI et al., 2005; SUVA, 2009). Ela bloqueia a formação óssea. A ausência do gene da ESC leva a uma condição chamada esclerosteose, caracterizada por elevada massa óssea.

O papel da via sinalizadora Wnt pode ser crucial na patogênese da baixa qualidade óssea observada no DM. Dados relativos a essa via no DM são limitados a modelos animais e foram focados na análise da expressão gênica ou na concentração de proteínas maiores no ambiente ósseo (NUCHE-BERENGUER et al., 2010; PORTAL-NÚÑEZ et al., 2010). Contudo, pouco se sabe especificamente sobre as relações da ESC com a fragilidade óssea observada no DM2.

Com o objetivo de levantar informações sobre a relação dos níveis de ESC circulante com a idade, sexo e massa óssea em humanos, um estudo avaliou 362 mulheres (123 na pré-menopausa, 152 na pós-menopausa sem terapia de reposição hormonal (TRH), 87 na pós-menopausa sob TRH e 318 homens de 21-97 anos (MÖDDER et al., 2011). Os níveis de ESC foram significativamente maiores nos homens do que nas mulheres. Em mulheres na pré e pós-menopausa que não utilizaram TRH (n = 275) e nos homens, os níveis de ESC foram associados positivamente com a idade. Ao longo da vida, os níveis séricos de ESC aumentaram 2,4 e 4,6 vezes nas mulheres e nos homens, respectivamente. Além disso, para uma determinada DMO de corpo total, os idosos (idade \geq 60 anos) apresentavam níveis mais elevados de ESC sérica do que os indivíduos mais jovens (entre 20 e 39 anos).

Um outro trabalho avaliou os determinantes fisiológicos da ESC sérica através de um estudo transversal, populacional, em larga escala, envolvendo 1.803 mulheres (de 20 - 79 anos), sendo 568 delas na pré-menopausa, além de 443 mulheres saudáveis (de 35 - 45 anos), que foram usadas para estabelecer o

intervalo normativo de referência para a ESC sérica; elas foram avaliadas quanto à DMO lombar e femoral e vários parâmetros bioquímicos e hormonais (ARDAWI et al., 2011). Observou-se um aumento dos níveis de ESC com a idade até os 45 anos de idade, que continuou elevando-se significativamente com os anos de pós-menopausa. Foram determinantes dos níveis de ESC nas mulheres na pré-menopausa a idade, paratormônio (PTH), estradiol (E2) e FSH (hormônio folículo estimulante); na pós-menopausa, idade, FSH e E2. Para o grupo com um todo, foram determinantes para o nível sérico de ESC a idade, OC, FSH e E2 séricos. Foi observada uma correlação negativa entre os níveis séricos de ESC e os valores de DMO lombar e femoral em todos os grupos, que desapareceu após ajuste para idade e IMC. Isso não foi visto nas mulheres na pós-menopausa, mas também ocorreu no grupo de mulheres na pré-menopausa (ARDAWI et al., 2011; MÖDDER et al., 2011).

Com o objetivo de estudar a via Wnt em pacientes diabéticos, um estudo transversal incluiu 74 pacientes diabéticos caucasianos de 30 - 65 anos e um grupo controle formado por 50 pacientes saudáveis (GARCÍA-MARTÍN et al., 2012). Foram avaliados os níveis de ESC sérica, marcadores do *turnover* ósseo, DMO e a presença de FVs morfométricas. Observou-se que os níveis de ESC circulante estavam aumentados em pacientes com DM2, principalmente em homens, nos quais houve uma correlação positiva com a idade. Além disso, a concentração sérica de ESC foi positivamente associada com os valores de DMO nos pacientes DM2, com a duração do DM e HbA1c, e inversamente com os marcadores de *turnover* ósseo estudados [OC, *bone alkaline phosphatase* (BALP), *C-telopeptide cross-linked collagen type 1* (CTX) e TRAP-5b], e significativamente mais baixa em pacientes osteoporóticos. Diante desses resultados os autores postularam que a via sinalizadora Wnt está alterada em pacientes DM2, o que promove deterioração da osteoblastogênese, redução da formação óssea e aumento da fragilidade óssea, ressaltando, entretanto, que mais estudos são necessários para avaliar o papel da ESC no metabolismo ósseo do DM e sua relação com o controle glicêmico desta população.

2.7 IGF-1

O hormônio do crescimento (*growth hormone* - GH) é um importante regulador do crescimento ósseo longitudinal durante a infância devido à sua

capacidade de estimular células precursoras na cartilagem epifisária. Evidências recentes, contudo, sugerem que este hormônio também tem um papel crucial na manutenção da massa óssea em adultos, onde ele regula a remodelação óssea através da interação complexa entre o GH, IGFs (*insulin-like growth factors* – fatores de crescimento semelhantes à insulina), IGFBPs (*insulin-like growth factors binding proteins* – proteínas ligadoras dos fatores de crescimento semelhantes à insulina) circulantes, e IGFs e IGFBPs produzidas localmente, através da ação endócrina, autócrina e parácrina dos citados elementos (UELAND, 2004). Estudos *in vitro* sugerem que GH/IGF-1 atuam sobre o metabolismo ósseo de várias maneiras: GH e IGFs podem se ligar a receptor do GH (GHR) ou das IGFs (IGFRI) em pré-osteoblastos ou osteoblastos maduros, induzindo diferenciação e proliferação dessas células, além de estimular a produção osteoblástica de IGFs e IGFBPs, que pode ter efeitos independentes dos IGFs, bem como regular a função do IGF-1 e IGF-2 por meio do sequestro destes. Os osteoblastos também podem induzir a síntese de colágeno e a mineralização do osso neoformado. Tanto GH quanto os IGFs podem regular a diferenciação e atividade osteoclástica. IGFs ligados ao IGFBP-5 e presos no osso e matriz óssea durante a formação óssea, podem ser liberados durante a reabsorção osteoclástica e tomar parte desses processos novamente, estimulando a atividade osteoblástica, acoplando a reabsorção e formação óssea (UELAND, 2004).

Alguns estudos prévios associam a presença e gravidade de FVs prevalentes negativamente com os níveis de IGF-1 em mulheres na pós-menopausa (KANAZAWA; YAMAGUCHI; SUGIMOTO, 2011). Um estudo transversal recente avaliou de maneira combinada a DMO e os níveis séricos de IGF-1 em relação ao risco de FV em 412 mulheres na pós-menopausa ($67,7 \pm 9,4$ anos) e 582 homens ($65,9 \pm 8,7$ anos) com DM2, incluindo marcadores de remodelação óssea (KANAZAWA, 2018). A associação com FV da DMO isolada, IGF-1 sérico isolado, e combinação da avaliação por DMO e IGF-1 foram examinadas. As análises de regressão logística múltipla mostraram que níveis de IGF-1 e T-escore da DMO (lombar e femoral) foram negativamente associados com FVs, exceto para IGF-1 em homens. Em uma análise de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi demonstrado que os valores de corte para IGF-1, T-score L1-L4 e T-escore de colo femoral foram de 127 ng / mL, - 1,78 e - 2,02 em mulheres na pós-menopausa, e 127 ng / mL, - 1,67, e - 1,24 nos homens, respectivamente. Com base nos valores

de corte, os sujeitos foram divididos em quatro categorias. A categoria de menor IGF-1 e menor T-escore teve um aumento significativo do risco de FVs em comparação com IGF-1 e T-escores mais elevados, tanto em mulheres pós-menopáusicas como em homens. A sensibilidade e especificidade da avaliação combinada para detectar FV foram melhores em comparação com o uso isolado da DMO ou IGF-1. Este é o primeiro estudo a mostrar que além da medição da DMO, a avaliação combinada da IGF-1 sérica é útil para estimar a prevalência de FV em pacientes com DM2 (KANAZAWA, 2018).

Outro estudo transversal investigou as relações entre níveis séricos de ESC, IGF-1 e FVs em mulheres com DM2 na pós-menopausa (ARDAWI et al., 2013). Foram estudadas 482 mulheres na pós-menopausa e 482 mulheres pareadas por idade sem DM2. As principais medidas de desfecho foram ESC sérica, IGF-1, DMO e marcadores de remodelação óssea, além de raio X laterais da coluna torácica e lombar para diagnosticar FVs. Os níveis séricos de ESC foram aumentados, enquanto os níveis de IGF-1 foram diminuídos quando as mulheres com DM2 foram estratificadas pelo número de FVs ($P < 0,0001$). Análise de regressão logística múltipla mostrou que os níveis séricos de ESC foram positivamente associados com 1 FV [*odds ratio* (OR) = 1,27, IC 95%: 1,01 – 2,03, $P = 0,016$], 2 FVs (OR = 1,41, IC 95%: 1,03 – 2,36, $P = 0,006$) e ≥ 3 FVs (OR = 1,54, IC95%: 1,12 – 2,44, $P = 0,005$). Os níveis séricos de IGF-1 foram inversamente associados com 1 FV (OR = 0,58, IC 95%: 0,39 - 0,88, $P = 0,041$), 2 FVs (OR = 0,42, IC 95%: 0,21 - 0,90, $P = 0,012$) e ≥ 3 FVs (OR = 0,19, IC 95%: 0,14 - 0,27, $P = 0,001$). Os autores concluíram que o aumento da ESC e a diminuição de IGF-1 foram associados com FVs entre mulheres com DM2 na pós-menopausa, sugerindo que ESC e/ou IGF-1 podem estar envolvidos no aumento da fragilidade óssea no DM2 e podem ser potenciais marcadores de gravidade da fragilidade óssea relacionada às FVs nesta população (ARDAWI et al., 2013).

2.8 HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

A histomorfometria óssea (HO) é uma ferramenta extremamente útil pois pode dar informações sobre a remodelação óssea tanto a nível estático como dinâmico (EPSTEIN et al., 2016a). Contudo, a relutância do paciente em submeter-se a este procedimento invasivo e a falta de histomorfometristas especializados limitam sua realização na prática clínica. De fato, o padrão-ouro para o estudo do

turnover ósseo é a HO quantitativa dinâmica, medida através da marcação prévia do tecido ósseo com agentes fluorescentes, como a tetraciclina, em esquema pré-determinado (DEMPSTER et al., 2013). A tetraciclina se deposita nos sítios de mineralização óssea e isto permite identificar a intensidade da formação e mineralização óssea, além do tempo e quantidade formada durante o período da marcação, ou seja, uma análise dinâmica do tecido ósseo.

A HO também possibilita a medida do volume ósseo, espessura das trabéculas e número das mesmas, permitindo assim uma avaliação da microestrutura óssea e a medida do volume, além das células (osteoblasto e osteoclasto) e osteoide, que é o osso não mineralizado (KULAK et al., 2010).

Os seguintes parâmetros são medidos na HO: a) parâmetros estruturais: volume ósseo (BV / TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação entre as trabéculas (Tb.Sp); b) parâmetros estáticos de formação óssea: espessura osteoide (O.Th), superfície osteoide (OS / BS); c) parâmetros dinâmicos de formação óssea: superfície de mineralização (MS / BS); , taxa de formação óssea (BFR), taxa de aposição mineral (MAR). A taxa de formação óssea dividida pela superfície correspondente (*bone formation rate/bone surface* – BFR) é considerada uma das melhores estimativas do *turnover* ósseo (MOREIRA; DEMPSTER, 2015).

Poucos estudos e com número reduzido de pacientes avaliaram biopsia óssea em pacientes com DM. O estudo inicial, publicado em 1970, realizou HO em pacientes com DM e mostrou reduzida formação óssea no osso cortical de 10 pacientes (WU et al., 1970). Outro estudo com HO em oito indivíduos, seis com DM2 e dois com DM1, mostrou que a taxa de formação óssea estava reduzida em aproximadamente 70% devido à redução tanto na superfície de mineralização quanto na taxa de aposição mineral (KRAKAUER et al., 1995). Um estudo brasileiro realizado em cadáveres estudou 26 pacientes com DM2, sendo 13 homens e 13 mulheres, com idade média de $67,4 \pm 2,7$ anos, com diagnóstico há $12,7 \pm 0,6$ anos, que foram comparados a um grupo controle de 20 indivíduos, sendo nove mulheres e 11 homens, com idade média de $54,9 \pm 4$ anos (LEITE DUARTE; DA SILVA, 1996). Esse estudo demonstrou marcada redução na superfície osteoblástica, no volume e espessura trabecular e da espessura cortical, demonstrando uma diminuição tanto dos parâmetros estáticos de formação óssea como também de microarquitetura.

Um estudo de caso-controle envolvendo 18 pacientes com diagnóstico de DM1 comparou os resultados da HO com marcação com tetraciclina e micro-CT (*micro-computed tomography*) óssea de biópsias ilíacas com 18 indivíduos-controle não diabéticos, pareados por idade e sexo (ARMAS et al., 2012). Cinco pacientes diabéticos tinham história prévia de fratura de baixo trauma. Não foram observadas diferenças significativas nos resultados de pacientes DM1 e controles em relação às medidas da HO ou de micro-CT. Entretanto, os diabéticos fraturados apresentaram tendências estruturais e dinâmicas diferentes dos diabéticos não fraturados, pelos dois métodos de análise. Os autores concluíram que o DM1 propriamente dito não resulta em anormalidades nas variáveis histomorfométricas ou de micro-CT ósseas na ausência de complicações crônicas da doença. Entretanto, aqueles diabéticos que sofreram fraturas podem apresentar defeitos na microarquitetura esquelética que podem estar por trás da fragilidade óssea observada nesta doença.

Através da biópsia óssea da crista ilíaca e uso de um software para HO é possível também medir os adipócitos da medula óssea, porém poucos estudos realizaram esta avaliação pela HO, nenhum deles em DM (COHEN et al., 2012). Esta análise é interessante principalmente em pacientes com DM, visto que as células adiposas e osteoblásticas apresentam a mesma origem mesenquimal.

De uma maneira geral, os achados de HO em DM demonstram que há uma tendência a um estado de baixo *turnover*, caracterizado por uma baixa formação óssea. Não há, até o momento, estudos de HO por biópsia de crista ilíaca, sob dupla marcação com tetraciclina, em pacientes portadoras de DM2 na pré-menopausa, correlacionando os seus parâmetros estáticos e dinâmicos ao grau de controle da doença baseado na HbA1c e à presença de complicações crônicas da doença.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 DESENHO

Estudo transversal, observacional, analítico.

3.2 PACIENTES

A amostra foi por conveniência. Foram convidadas a participar do estudo pacientes do sexo feminino em tratamento no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR (SEMPR) com o diagnóstico médico prévio, firmado por um endocrinologista, de Diabetes Mellitus tipo 2 (CID-10: E11.x). Todas as pacientes estavam em uso de pelo menos um medicamento hipoglicemiante oral e/ou insulina. O protocolo de estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Parecer Nº 1.646.120, de 24/07/2016). Todas as pacientes foram selecionadas e incluídas no estudo entre 30/08/2016 e 17/10/2017, mês em que se encerrou a coleta de dados, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Vinte e oito pacientes assinaram o TCLE, duas desistiram de submeter-se à biópsia óssea por motivos pessoais, de modo que 26 pacientes completaram o protocolo do estudo.

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: mulheres com diagnóstico de DM2 há pelo menos 1 ano, idade superior a 30 anos e inferior a 50 anos, estar no menácrme, não estar em uso medicamentos que interfiram no metabolismo osteomineral como esteroides, anticonvulsivantes, bisfosfonatos, análogos do LHRH (hormônio liberador das gonadotrofinas) e TZDs. A data da última menstruação foi aferida e as mulheres histerectomizadas tiveram avaliados níveis de FSH e estradiol séricos.

Foram critérios de exclusão: mulheres na pós-menopausa, pacientes com outras causas secundárias de osteoporose ou com doenças que interferem no metabolismo ósseo (hipertireoidismo, doença de Cushing, hipotireoidismo descompensado e hiperparatireoidismo) ou que estejam usando qualquer medicação que interfira no metabolismo ósseo, além de nefropatia diabética cujo clearance de creatinina estimado (CKD-EPI - Chronic Kidney Disease CKD Epidemiology Collaboration) fosse inferior a 30 ml / min / 1,72 m² de área corporal.

Todas as pacientes foram submetidas a uma consulta inicial onde passaram por anamnese completa, responderam a questionários sobre ingestão diária de cálcio dietético, sobre hábitos de realização de atividade física programada (sim ou não), história de tabagismo e etilismo prévio ou atual (sim ou não), conforme previamente publicado (PEREIRA et al., 2009; RADOMINSKI et al., 2017). Além disso, passaram por exame físico completo, avaliação de índices antropométricos, cálculo do índice de massa corporal (IMC, índice de *Quetelet*) e medida da pressão arterial.

Ao término da consulta a paciente tinha agendada a data da realização da DMO, coincidente com a data da coleta da amostra de sangue; a data da realização da biópsia óssea, recebendo a prescrição da tomada da tetraciclina (500 mg de 12/12 h por 3 dias, seguido de um intervalo de 10 dias, com mais um curso de 500 mg de 12/12hs por mais 3 dias), com a biópsia sendo programada para ser realizada no terceiro dia após o término do segundo ciclo de 3 dias de tetraciclina. Além disso, os exames radiológicos de coluna eram agendados no Hospital de Clínicas da UFPR.

3.3 CONTROLES DE EXAMES

Treze mulheres híginas, de 30 a 50 anos de idade, no menácme, médicas ou de outras profissões laborais no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), híginas e não usuárias de quaisquer medicamentos que podem interferir no metabolismo ósseo, aceitaram participar do estudo e colheram amostras de sangue após uma noite de 12 horas de jejum, cujo sangue foi centrifugado, o soro extraído e congelado a -60°C até a data da realização dos ensaios para dosagem de PEN e IGF-1. Além disso, todas as mulheres do grupo controle-saudável foram submetidas à medida dos índices antropométricos para cálculo do IMC, e submetidas a DMO de coluna lombar, colo de fêmur, fêmur total e composição corporal (dados não utilizados no presente estudo).

3.4 CONTROLES DA HISTOMORFOMETRIA

Devido a fatores éticos, a realização de biópsias ósseas em indivíduos saudáveis é limitada. Por este motivo, usamos como controles para os parâmetros histomorfométricos 15 biópsias ósseas obtidas *post-mortem* de mulheres saudáveis pré-menopausadas brasileiras (13 caucasianas e duas negras), com idade entre 30 e 50 anos, conforme publicado anteriormente (DOS REIS et al., 2007). Os dados foram obtidos diretamente dos autores da Universidade de São Paulo. Para alcançar a correspondência etária e racial de casos e controles, excluimos do grupo controle (GC) as amostras de mulheres de etnia e grupos etários diferentes daqueles incluídos no grupo de estudo principal. Os dados antropométricos dessas pacientes não estavam disponíveis.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Densitometria óssea

A DMO foi avaliada por absorciometria radiológica de dupla energia (DXA) em um dispositivo Lunar Prodigy (GE Medical Systems, Madison, WI, EUA) equipado com o programa Encore. Os testes foram realizados no SEMPR por um mesmo profissional. As avaliações incluíram as regiões da coluna lombar (LS), colo femoral (FN) e fêmur total (TFe), além da composição corporal (dados não utilizados no presente estudo). O valor da variação significativa no intervalo de confiança de 95%, obtido para coluna lombar e fêmur total, foi de 0,036 g / cm² e 0,22 g / cm², respectivamente.

3.5.2 Métodos analíticos laboratoriais

Após uma noite de 12hs de jejum, foram colhidos pela rotina do Laboratório Clínico do HC-UFPR os seguintes exames: hemograma, coagulograma, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, cálcio sérico total, fosfato inorgânico, PTH intacto, 25-OH-Vitamina D, creatinina, cálcio urinário de 24hs, fosfatase alcalina e relação albumina/creatinina (microalbuminúria isolada).

Obtivemos os seguintes exames, realizados no Laboratório de Patologia Clínica do HC-UFPR: glicemia de jejum (ensaio hexokinase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), valor de referência [VR] <100 mg / dL), hemoglobina glicada (método enzimático – National Glycohemoglonin Standardization Program (NGSP) , VR <5,7% [International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) = 68 mmol / mol]), cálcio (Arzenazo III, VR = 8,5-10,2 mg / dL), fosfato inorgânico (fosfomolibdato UV, VR = 2,3-4,7 mg / dL), 25-OH-vitamina D (imunoquimioluminescência; MAGLUMI®, VRs = deficiente quando <20 ng / mL, insuficiente quando <30 ng / mL e normal quando ≥ 30 ng / mL de acordo com a classificação da *Endocrine Society* (HOLICK et al., 2011)), creatinina (picrato cinético alcalino, VRs em mulheres = 0,57-1,1 mg / dL), microalbuminúria (ensaio de turbidimetria, VRs <30 mg / g de creatinina), PTH intacto (quimiluminescência;

Chemiflex, VR = 15-68 pg / mL), FSH (quimiluminescência-CMIA, VR em mulheres na pós-menopausa > 30 mIU / mL), estradiol (quimiluminescência - CMIA, VR em mulheres na pós-menopausa <10 pg / mL). O cálcio urinário foi medido em urina de 24 horas (Arzenazo III, VR = 100-250 mg / 24h). Todos os ensaios descritos acima, exceto o utilizado para medir a 25-OH-vitamina D, foram realizados utilizando o equipamento ARCHITECT (Solução Total da Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, EUA).

Medidas séricas de IGF-1 e pentosidina (PEN) foram realizadas em duplicata, e o cálculo de seus valores médios foi realizado no Serviço de Imunopatologia do HC-UFPR. Utilizamos o kit ELISA ABCA-AB108873 (Abcam, Cambridge, MA, EUA) para a dosagem do IGF-1. De acordo com o manual, a precisão intra-ensaio é de 4,9% e a precisão inter-ensaio é de 9,9%, o intervalo de referência é de 30 a 300 ng / mL e o limite de detecção é de 0,95 ng / mL. Para a dosagem de PEN foi utilizado o kit ELISA CUSA-CSBE9415H (CUSABIO Technology LLC, Houston, TX, EUA; precisão intra-ensaio < 8%, precisão inter-ensaio < 10%); a faixa de referência não é fornecida com o kit, a faixa de detecção é de 31,25-2000 pmol / mL e o limite de detecção é de 7,81 pmol / mL.

3.5.3 Avaliação das complicações crônicas microvasculares

A presença de CCs foi avaliada a partir de prontuários e exames complementares. Um especialista em retina (FPS) classificou os pacientes como tendo ou não retinopatia diabética por imagens de retinografias seriadas documentadas por fotografia (DRS, Digital Retinopathy System, Centervue Spa, Itália). Quando anormal, a retinografia foi complementada por retinografia fluorescente (Triton Plus, Topcon, Japão). Os pacientes também foram classificados como tendo ou não nefropatia diabética com base na presença de uma relação albumina/creatinina urinária > 30 mg/g creatinina em uma amostra de urina aleatória. Pacientes com sintomas de infecção do trato urinário foram excluídos. Os pacientes foram então alocados para o grupo com CCs com base na presença de retinopatia ou nefropatia. No total, 9 pacientes tinham evidências de CCs, dos quais 7 tinham retinopatia diabética inicial e 3 tinham nefropatia incipiente. Um paciente teve retinopatia e nefropatia.

3.5.4 Exames Radiológicos

Todos os pacientes submeteram-se a exames de RX lateral de coluna torácica e coluna lombar, em aparelhos convencionais do Serviço de Radiologia do HC-UFPR, e as imagens foram digitalizadas. Foi estabelecida uma distância foco-filme de 40 polegadas (102 cm) e o feixe de RX centralizado em T8 e L3, respectivamente. Todas as imagens foram analisadas pelo mesmo especialista (DDSC), radiologista da clínica radiológica Diagnósticos Avançados por Imagem (DAPI), de Curitiba, Paraná, e aluno do curso de Mestrado do HC-UFPR. O diagnóstico de fratura morfométrica vertebral baseou-se numa diferença de mais de 20% na relação da altura vertebral entre medidas feitas num ponto posterior, médio ou anterior da vértebra analisada, de acordo com a técnica previamente descrita (GENANT et al., 1993), de T4 a L4. Esse método semiquantitativo usa os recursos da forma vertebral e o grau de redução da altura vertebral na dimensão vertical anterior, média ou posterior para classificar o corpo vertebral como normal (sim ou não). Em resumo, uma redução superior a 20% na altura anterior, média e / ou posterior em uma determinada vértebra foi considerada como FV.

3.5.5 Biópsia óssea transilíaca

Uma vez analisados os exames laboratoriais iniciais pré-procedimento de biópsia, as pacientes que não apresentaram nenhuma alteração laboratorial foram liberadas para biópsia. As pacientes descompensadas (com glicemia de jejum maior do que 130 mg/dl e/ou glicemia pós-prandial maior do que 180 mg/dl) tiveram ajuste da dose de sua medicação hipoglicemiante. Como já foram devidamente orientadas na consulta inicial, este segundo contato para análise dos exames foi usado para relembrar e reforçar as regras quanto ao uso de tetraciclina, seguindo o seguinte esquema (3:10:3): tetraciclina 500mg duas vezes ao dia por 3 dias (marcação 1), seguido por um período sem tetraciclina de 10 dias e após mais 3 dias de tetraciclina na mesma dose inicial (marcação 2), sendo as biópsias realizadas no terceiro dia após a última dose de tetraciclina. Durante o período de uso de tetraciclina, contato telefônico foi realizado para certificar que as pacientes estavam tomando a medicação adequadamente. Todas as biópsias foram realizadas no Centro Cirúrgico Ambulatorial do HC-UFPR, em condições estéreis, com as pacientes previamente

sedadas com uma injeção IM de 5mg de midazolan administrada 30 minutos antes do procedimento. O local anatômico das biópsias foi a crista ilíaca a 2cm posterior e inferior da espinha ilíaca ântero-superior. Inicialmente, com a paciente em decúbito dorsal, procedia-se a assepsia da região ilíaca com álcool iodado, colocando-se, em seguida, sobre a região, um campo cirúrgico fenestrado. Após anestesia local de todos os planos, pele, subcutâneo e periósteo externo e interno com lidocaína 2% (10 a 20ml), procedia-se incisão de 3 cm na pele, seguido de divulsão dos planos subcutâneo e muscular, dirigindo-se ao periósteo, até criar um pertuito entre a pele e o periósteo externo. Neste pertuito era introduzida a trefina de *Bordier* com diâmetro interno de 7,5 mm e com seus bordos serrilhados fixando-se ao periósteo externo. Em seguida, conectamos a porção distal da trefina a um drill elétrico (Gauthier Medical, Rochester, MN, EUA), o qual propiciou o avanço da trefina lentamente através do tecido ósseo até atingir o osso cortical interno. Após a transfixação do osso ilíaco, a trefina era retirada, o fragmento ósseo desprendido do lúmen da trefina, e imediatamente fixado em etanol a 70%. Após extração do fragmento fazia-se compressão hemostática com gaze durante 10 minutos e, em seguida, sutura da pele com fio mononylon 3.0, e curativo compressivo local. As pacientes eram orientadas a ficar em decúbito lateral por 2 horas sob observação, e após eram liberadas para casa, com a orientação de restrição da atividade física durante as próximas 48 horas e uso de analgésicos, se necessário. Todas as pacientes retornaram 7 dias após a biópsia para retirada dos pontos e avaliação da cicatriz. Todas as biópsias foram realizadas por um nefrologista do HC-UFPR (DCC), coautor do presente estudo. Não houve intercorrências durante a realização das biópsias ou na evolução após a realização delas até a retirada dos pontos.

3.5.6 Preparação do material da biópsia óssea e avaliação

Os fragmentos permaneceram inicialmente em frascos com etanol a 70% por 3 dias (fixação), seguido por 3-5 dias em etanol a 100% (desidratação) e depois em tolueno (clareamento) por mais um dia. Em seguida, os fragmentos eram embebidos por 3 dias em 3 diferentes soluções contendo metilmetacrilato: solução I (25% de dibutilftlato/75% de metilmetacrilato); solução II (25% de dibutilftlato/75% de metilmetacrilato + 1g de peróxido de benzoíla [1%]); solução III (25% de dibutilftlato/75% de metilmetacrilato + 2g peróxido de benzoíla [2%]). Posteriormente,

os fragmentos – ainda dentro dos vidros – eram colocados em uma estufa a 37°C por 24 horas, até a total polimerização do metacrilato. O frasco era então quebrado, formando, com o auxílio de uma serra, um bloco retangular, que era lixado na sequência. A partir dos blocos, fragmentos com espessura de 7 e 10 µm eram obtidos através de um micrótomo com lâminas de tungstênio, específicas para o tecido ósseo, posteriormente coradas com azul de toluidina (7 µm). O preparo do fragmento para a leitura da HO foi realizado pelo mesmo técnico. Todos os procedimentos utilizados são padronizados no laboratório PRO, da Fundação Pró-Renal, em Curitiba, Paraná (KULAK et al., 2010).

3.5.7 Histomorfometria óssea

Todas as análises de HO foram realizadas pelo mesmo investigador (CAM) usando um microscópio (Nikon Labophot II, Tóquio, Japão) equipado com câmera de vídeo colorida de alta resolução UV (Olympus DP71, Center Valley, PA, EUA). O sistema de análise de imagem utilizado foi o OsteoMeasure (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA, EUA). A análise foi realizada na Fundação Pró-Renal (Curitiba, Paraná, Brasil). Foram analisados: a) parâmetros estruturais (volume ósseo [BV/TV], espessura trabecular [Tb.Th], número de trabéculas [Tb.N] e separação entre as trabéculas [Tb.Sp]); b) parâmetros estáticos de formação óssea (espessura osteoide [O.Th] e superfície osteoide [OS/BS]); e parâmetros dinâmicos de formação óssea (superfície mineralizadora [MS/BS], taxa de formação óssea [BFR] e taxa de aposição mineral [MAR]), que foram avaliados conforme descrito anteriormente (LINDSAY et al., 2006), cujos índices são expressos de acordo com as recomendações do Comitê de Nomenclatura da *American Society of Bone and Mineral Research* (ASBMR) (DEMPSTER et al., 2013).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 23, e o programa GraphPad Prism 8 para elaboração dos gráficos. A normalidade das variáveis do estudo foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Todas as variáveis contínuas são apresentadas como valores de média ± desvio padrão (DP). A igualdade de variância foi avaliada com o teste de Levene. Para comparar os valores

médios dos pacientes e controles, usamos o teste t de Student para amostras independentes quando a normalidade foi demonstrada, e o teste U de Mann-Whitney para distribuições não normais. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar as variáveis categóricas. Todas as análises utilizaram testes bicaudais com nível mínimo de significância de 5%. Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman avaliaram associações entre variáveis contínuas com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Apresentam-se nas páginas seguintes dois artigos. Um foi submetido à revista *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, de classificação A1 segundo avaliação da Plataforma Sucupira, com título “BONE HISTOMORPHOMETRY IN YOUNG PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES IS AFFECTED BY DISEASE CONTROL AND CHRONIC COMPLICATIONS”, em 21/05/2019. Este artigo foi aceito e já publicado na versão *on line* da revista no dia 07/10/2019 (ANDRADE et al., 2019). O segundo artigo tem a comprovação da submissão à revista *Osteoporosis International*, de classificação B1, com o título “Bone Fragility in Premenopausal Patients with Type 2 Diabetes Mellitus And Its Correlation With Bone Volume And Osteoblastic Function: A Cross-Sectional Study”, na data de 09/05/2019, exposta em seguida. O artigos estão formatados segundo os parâmetros exigidos pelos periódicos.

4.1.1 PRIMEIRO ARTIGO

BONE HISTOMORPHOMETRY IN YOUNG PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES IS AFFECTED BY DISEASE CONTROL AND CHRONIC COMPLICATIONS

SHORT TITLE: BONE HISTOMORPHOMETRY IN PREMENOPAUSAL PATIENTS WITH T2DM

Vicente F. C. Andrade¹, MD; Domingos C. Chula², MD; Fábio P. Sabbag³, PhD; Daniel D. da S. Cavalheiro⁴, MD; Lorena Bavia⁵, PhD; Altair Rogério Ambrósio⁵, MSc; Cleber Rafael V. da Costa⁶; MsC, Luciene M. dos Reis⁷, PhD; Victória Z. C. Borba¹, MD, PhD; Carolina Aguiar Moreira^{1,6}, MD, PhD

Authors' Affiliations

1 Endocrine Division (SEMPR), Department of Internal Medicine, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil; Carolina Aguiar Moreira, e-mail: carolina.aguiar.moreira@gmail.com; Victória Z.C. Borba, e-mail, vzcborba@gmail.com

2 Nephrology Unit, Clinics Hospital of Federal University of Parana, Brazil, e-mail: domingoschula@gmail.com

3 Ophthalmologist, retinal and vitreo specialist at the Medical School of Ribeirão Preto, São Paulo University, Brazil, e-mail: drfabiosabbag@gmail.com

4 Radiologist at the radiology clinic Advanced Diagnostic Imaging (DAPI), Curitiba, Parana, and Master in Science from the Postgraduate Program in Internal Medicine of the Federal University of Parana, e-mail: mr.cavalheiro@gmail.com

5 Laboratory of Molecular Immunopathology, Postgraduate Program in Internal Medicine and Health Sciences, Clinics Hospital of Federal do Parana University, Brazil; Lorena Bávía, e-mail: lorena.bavia@gmail.com; Altair Rogério Ambrósio, e-mail: altairambrosio@gmail.com

6 Laboratory PRO – section of bone histomorphometry, Fundação Pró-Renal, Curitiba, Brazil; Cleber Rafael V. da Costa, e-mail: costacrv@gmail.com; Carolina de Aguiar Moreira, e-mail: carolina.aguiar.moreira@gmail.com

7 LIM 16 – Laboratory of Renal Physiopathology, Clinics Hospital (HCFMUSP), School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil, e-mail: lucienem@usp.br

Corresponding Author

Vicente Florentino Castaldo Andrade

vicente.andrade@hc.ufpr.br; vfca@terra.com.br

SEMPR

Rua Agostinho de Leão Jr, nº 285, CEP: 80030-110, Curitiba-PR, Brazil

Disclosure of potential conflicts of interest:

Vicente F.C. Andrade, Domingos C. Chula, Fábio P. Sabbag, Daniel D. da S. Cavalheiro, Lorena Bávila, Altair Rogério Ambrósio, Cleber Rafael V. da Costa, Luciene M. dos Reis, Victória Z.C. Borba, and Carolina de Aguiar Moreira declare that they have no competing financial interests.

Disclosure Summary

I, Vicente F.C. Andrade, the designated corresponding author, on behalf of myself and my co-authors, hereby transfer and assign all right, title, and interest, including copyright and any moral rights, in and to the manuscript named in this submission (called the Work hereafter) to the Endocrine Society (ES). If ES ultimately declines to publish the Work in an ES journal, all rights in and to the Work will revert to the author(s).

Funding

The work and the manuscript were done with resources of the own authors.

ABSTRACT

Context: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with an increased risk of fractures. No study has evaluated the correlation of bone histomorphometry (BH) parameters with glycemic control and presence of chronic complications (CCs) in premenopausal women with T2DM.

Objectives: To evaluate BH and correlate them with the degree of glycemic control and presence of CCs.

Design, settings and patients: This was a cross-sectional study conducted at tertiary medical center. Twenty-six premenopausal women with T2DM were divided into groups with HbA1c < 7% (GC, n = 10) and HbA1c > 7% (PC, n = 16), and further subdivided into groups with (n = 9) and without (n = 17) CCs. BH parameters (bone volume [BV/TV], trabecular thickness [Tb.Th], trabecular number [Tb.N], trabecular separation [Tb.Sp], osteoid thickness [O.Th], osteoid surface [OS/BS]), mineralizing surface [MS/BS], bone formation rate [BFR] and mineral apposition rate [MAR]) as well as serum pentosidine (PEN) and IGF-1 were

measured. The BH data were compared among the groups and with a BH control group (control group, CG, n = 15) matched by age, sex and race.

Results: BV/TV was increased in GC ($P < 0.001$) and PC ($P = 0.05$) groups and O.th ($P = 0.03$) was smaller in the PC group than CG. A comparison of the groups with and without CCs with the CG showed in the group with CCs, O.Th was smaller ($P = 0.01$) and BV/TV similar to the CG ($P = 0.11$). HbA1c correlated negatively with O.Th ($P = 0.02$) and OS/BS ($P = 0.01$). No correlation of BH to PEN and IGF-1.

Conclusion: BH in premenopausal patients with T2DM is affected by disease control and chronic complications.

KEYWORDS: Type 2 diabetes mellitus, bone disease, bone histomorphometry, vertebral fractures, bone quality, pentosidine.

Précis

Premenopausal women with type 2 diabetes mellitus with inadequate glycemic control and chronic complications have lower bone turnover than women with good control and no chronic complications.

1. INTRODUCTION

Osteoporosis has been recently identified as a chronic complication (CC) of type 2 diabetes mellitus (T2DM), with studies showing an increased risk of fractures in patients with this condition (1–4). However, patients with T2DM may have similar or greater bone mineral density (BMD) than patients without diabetes (5), suggesting that instead of affecting BMD, T2DM may be associated with reduced bone quality.

The effect of T2DM on bone tissue may occur through different hormonal and biochemical factors, but there is no consensus in the literature on this subject. One established abnormality in T2DM, involves low bone remodeling, which may lead to increased fragility; this seems to be related to increased serum sclerostin (ESC), an inhibitor of the Wnt canonical pathway (6). In addition, in postmenopausal women with T2DM, other studies associate increase of ESC along with a reduction of IGF-1 as a risk factor for vertebral fractures (7–9). Corroborating these studies, a recent meta-analysis characterized DM a generalized state of low bone turnover which also osteoprotegerin, a substance that negatively modulates osteoclastic activity, would be elevated (10).

Furthermore, the accumulation of AGEs (advanced glycosylation end-products) seems to be related to the reduction of bone quality in T2DM. Pentosidine (PEN) is the most studied AGE in DM bone disease, and some studies have reported high serum and urinary levels of PEN is associated to an increase risk of vertebral

fractures (11–13), although the literature in this regard is conflicting (14). It is important to emphasize that the increase in fracture risk is also due to the fact that patients with diabetes present a higher risk of falls compared to non-diabetic patients, due to several inherent factors such as the long-term evolution of the disease, hypoglycemia, neuropathy, retinopathy, balance disorders, polypharmacy, and others (4,15,16). Also, recently bone marrow fat accumulation has been identified as a potential marker or mechanism for diabetes-related skeletal fragility (17).

The technique of bone histomorphometry (BH) analyzes the cortical and trabecular microarchitecture of bone biopsy specimens. This technique is considered the gold standard for the study of bone remodeling and is widely used in studies on bone metabolism. Few studies to date have evaluated BH in patients with diabetes, and most of those that have done so have demonstrated increased bone volume and reduced bone formation associated with this disease (18–22). Still, no study has evaluated the correlation of histomorphometric parameters with glycemic control and presence of CCs of diabetes. Based on these considerations, the aim of this study was to evaluate structural and remodeling BH parameters in premenopausal women with T2DM, correlating these parameters with the degree of glycemic control and presence of CCs of diabetes.

2. MATERIAL AND METHODS

This was a cross-sectional, observational, analytical study.

A) Patients

Women diagnosed with T2DM and attending the Endocrinology and Metabology Service of the Federal University of Paraná (SEMPR) were invited to participate in the study. All patients used at least one oral hypoglycemic drug and/or insulin. The inclusion criteria were a diagnosis of T2DM with duration of at least 1 year, premenopausal status, and age between 30 and 50 years. The exclusion criteria were secondary causes of osteoporosis and presence of diseases or use of medications known to interfere with bone mineral metabolism, in addition to chronic kidney disease (CKD) with a calculated creatinine clearance (CKD-EPI) below 30 mL/min/1.72 m² of body area. The sample was for convenience and all patients were included in the study between 8/30/2016 and 10/17/2017, the month in which data collection was completed.

The study was approved by the Ethics and Research Committee of the Clinics Hospital (HC-UFPR), and all patients signed the informed consent form (ICF).

B) Clinical evaluation

The clinical evaluation included a detailed assessment of lifestyle habits, history of trauma and fractures, with questionnaires investigating the daily intake of dietary calcium, habits of programmed physical activity, smoking, and drinking, as previously published (23,24). Other assessments included anthropometric and blood pressure measurements and calculation of body mass index (BMI, Quetelet index).

C) Evaluation of chronic complications

The presence of CCs was evaluated from medical records and complementary tests. A retina specialist (FPS) classified the patients as having or not having diabetic retinopathy by serial retinography images documented by photography (DRS, Digital Retinopathy System, Centervue Spa, Italy). When abnormal, the retinography were supplemented by fluorescent retinography (Triton Plus, Topcon, Japan). The patients were also classified as having or not having diabetic nephropathy based on the presence of a urinary albumin/creatinine ratio > 30 mg/g creatinine in a random urine sample. Patients with symptoms of urinary tract infection were excluded. The patients were then allocated to the CC group based on the presence of retinopathy or nephropathy. In total, 9 patients had evidence of CCs, in which 7 had early diabetic retinopathy and 3 had incipient nephropathy. One patient had both retinopathy and nephropathy.

D) Bone densitometry

BMD was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) in a Lunar Prodigy device (GE Medical Systems, Madison, WI, USA) equipped with the Encore program. The tests were performed at the Bone Metabolism Unit of SEMPR. The assessments included the regions of the lumbar spine (LS), femoral neck (FN), and total femur (TF), in addition to body composition. All tests were performed by the same technician. The value of least significant variance at 95% confidence level, obtained for lumbar spine and total femur, was 0.036 g/cm^2 and 0.22 g/cm^2 , respectively.

E) Biochemical evaluation

We obtained the following tests, performed at the Laboratory of Clinical Pathology at HC-UFPR: fasting blood glucose (hexokinase and G-6-PD assay, reference value [RV] $< 100 \text{ mg/dL}$), glycosylated hemoglobin (enzymatic method - NGSP, RV $< 5.8\%$ [IFCC = 68 mmol/mol]), calcium (Arzenazo III, RVs = $8.5\text{--}10.2 \text{ mg/dL}$), inorganic phosphate (phosphomolybdate UV, RVs = $2.3\text{--}4.7 \text{ mg/dL}$), 25-OH-vitamin D (immunochemiluminescence; MAGLUMI®, RVs = deficient when $< 20 \text{ ng/mL}$, insufficient when $< 30 \text{ ng/mL}$, and normal when $\geq 30 \text{ ng/mL}$ according to the Endocrine Society classification), creatinine (alkaline kinetic picrate, RVs in women = $0.57\text{--}1.1 \text{ mg/dL}$), albuminuria (turbidimetry assay, RVs $< 30 \text{ mg/g}$ of creatinine), intact

PTH (chemiluminescence; Chemiflex, RV = 15-68 pg/mL), FSH (chemiluminescence - CMIA, RVs in postmenopausal women > 30 mIU/mL), estradiol (chemiluminescence - CMIA, RVs in postmenopausal women < 10 pg/mL). Urinary calcium was measured in 24-hour urine (Arzenazo III, RVs = 100-250 mg/24h). All assays described above, except for the one used to measure 25-OH-vitamin D, were performed using the equipment ARCHITECT (Abbott Diagnostics Total Solution, Abbott Park, Illinois, USA).

Each patient had two HbA1c measurements and an average of both values was used. The first was in the screening period, about 1-3 months before inclusion, in which only HbA1c levels were evaluated. The second was measured two weeks before bone biopsy, along with all other biochemical tests. Based on this result, patients were divided into two groups: good control (GC, <7%) and poor control (PC, > 7%).

Serum measurements of IGF-1 and pentosidine (PEN) were performed in duplicate, and the calculation of their mean values was performed at the Immunopathology Service at HC-UFPR. We used the ELISA kit ABCA-AB108873 (Abcam, Cambridge, MA, USA) for IGF-1 measurement. According to the manual, the intra-assay precision is 4.9% and the interassay precision is 9.9%, the reference range is 30-300 ng/mL, and the detection limit is 0.95 ng/mL. To measure pentosidine, we used the ELISA kit CUSA-CSBE9415H (CUSABIO Technology LLC, Houston, TX, USA; intra-assay precision < 8%, interassay precision < 10%); the reference range is not provided with the kit, the detection range is 31.25-2000 pmol/mL and the detection limit is 7.81 pmol/mL.

F) Transiliac bone biopsy

Prior to undergoing bone biopsy, all patients received tetracycline as follows: oral tetracycline hydrochloride 500 mg twice daily for 3 days (Label 1), followed by a 10-day interval without the medication and 3 additional days of tetracycline hydrochloride 500 mg twice daily (Label 2). After 3 to 5 days from the last day of Label 2, transiliac bone biopsy was performed following a standard procedure (25). The biopsies were obtained from a standard site, approximately 2 cm posterior and inferior to the right anterior-superior iliac spine using a Bordier trephine with a serrated edge and internal diameter of 7.5 mm to obtain sufficient tissue for analysis. The bone specimens were fixed and dehydrated using standard procedures at the PRO Laboratory of the Pro-Renal Foundation in Curitiba, Brazil (26).

G) Bone histomorphometry

All BH analyses were performed by the same investigator (CAM) using a microscope (Nikon Labophot II, Tokyo, Japan) equipped with UV, high-resolution digital color video camera (Olympus DP71, Center Valley, PA, USA). The image analysis system used was OsteoMeasure (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA, USA). The

analysis was carried out at the Pro-Renal Foundation (Curitiba, Paraná, Brazil). Structural (bone volume [BV/TV], trabecular thickness [Tb.Th], trabecular number [Tb.N], and trabecular separation [Tb.Sp]), static (osteoid thickness [O.Th] and osteoid surface [OS/BS]), and dynamic parameters (mineralizing surface [MS/BS], bone formation rate [BFR], and mineral apposition rate [MAR]) were evaluated as previously described (27). The indices are expressed according to the recommendations by the ASBMR Nomenclature Committee (28).

H) Histomorphometric controls

We used as control group (CG) for histomorphometric parameters 15 bone biopsies obtained postmortem from premenopausal, healthy women (13 Caucasian and two black) aged 30 to 50 years, as previously published (29). The data were obtained directly from the authors. To achieve age and race matching of cases and controls, we excluded from the CG those samples from women of ethnic and age groups other than those included in the main study group. The anthropometric data of these patients were not available.

I) Statistical analysis

The statistical analysis was performed with SPSS, version 23, and GraphPad Prism 8. The normality of the study variables was verified with the Shapiro-Wilk test. All continuous variables are presented as mean \pm standard deviation (SD) values. Variance equality was evaluated with Levene's test. To compare the mean values of patients and controls, we used Student's *t* test for independent samples when normality was demonstrated, and Mann-Whitney's *u* test for non-normal distributions. Fisher's exact test was used to evaluate categorical variables. All analyses used two-tailed tests with a minimum significance level of 5%. Pearson's and Spearman's correlation coefficients evaluated associations between continuous variables with parametric and nonparametric distribution, respectively.

3. RESULTS

In all, 28 patients signed the ICF and were included in the study protocol. Two patients withdrew participation soon after inclusion, resulting in a final cohort of 26 patients who underwent bone biopsy. The twenty-six patients were divided into groups good control, with HbA1c < 7% (GC, n = 10), and poor control, HbA1c > 7% (PC, n = 16), and further subdivided into groups with (W/CC, n = 9) and without (Wo/CC, n = 17) CCs. The mean age of the overall cohort was 41.6 ± 4.6 years (range 34–49 years) and 3 of the 26 patients were black (Table 1). The mean BMI of the participants was 32.4 ± 3.9 kg/m²; 9 (34.6%) patients were overweight, 11 (42.3%) were class 1 obese, 5 (19.2%) were class 2 obese, and 1 (3%) was class 3 obese (Table 1). Nine patients had CCs (34.6%), of whom 7 had early diabetic retinopathy, 3 had incipient diabetic nephropathy and one had

both retinopathy and nephropathy. The presence of CCs (in general) and retinopathy (in particular) was significantly greater in the poorly controlled (PC) group (Fischer exact test, $P = 0.04$). No patient reported a history of fragility fracture. Regarding lifestyle habits, 5 patients had a previous or current history of smoking and 4 patients had a history of alcoholism, while 7 patients practiced regular physical activity. The mean daily intake of dietary calcium was 320 ± 447 mg/24h. The most common comorbidities were hypertension (50%), prior history of surgically treated biliary disease (27%), dyslipidemia (26.9%), nephrolithiasis (11.5%), and hypothyroidism (7.5%). All patients with hypothyroidism had serum TSH levels within the reference values prior to biopsy. Overall, 2 (7.7%) patients used insulin alone, while 11 (42%) used insulin associated with hypoglycemic drugs. The association of insulin and hypoglycemic drugs was more frequent in patients with PC compared with those with GC (Fischer exact test, $P = 0.014$). The oral hypoglycemic drugs used by the participants, with or without associated insulin, included sulphonylureas ($n = 6$, 23%), metformin ($n = 23$, 88%), dipeptidyl peptidase 4 inhibitor (iDPP4; $n = 1$, 3.8%), and type 2 sodium-glucose cotransporter inhibitors (iSGLT2; $n = 3$, 11.5%).

Regarding clinical (age, time of diagnosis of T2DM, ethnicity) and anthropometric characteristics (BMI), there was no significant difference between GC and PC groups (Mann-Whitney u test and Fischer exact test, Table 1).

TABLE 1 – CLINICAL, ETHNIC AND ANTHROPOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION AND COMPARISON BETWEEN THE GROUPS WITH GOOD CONTROL (GC, HbA1c <7%) VERSUS POOR CONTROL (PC, HbA1c > 7%)

		Total (n=26)	HbA1c <7% (n=10)	HbA1c >7% (n=16)	value
Clinical characteristics	Age (years)	41.6 \pm 4.6	42 \pm 4.9	41 \pm 4.6	0.77
	Disease duration (years)	9.5 \pm 5.4	10 \pm 6.9	9.3 \pm 4.5	0.96
	Ethnicity (black/white)	3 / 23	2/8	1/15	0.54
	BMI (Kg/m²)	32.4 \pm 3.9	32.1 \pm 3.6	32.5 \pm 4.1	0.90

Abbreviation: BMI – body mass index

On the other hand, regarding biochemical tests (Table 2), there was a significant difference in glycemia and HbA1c values, which were increased in the PC group (Mann-Whitney u test, both, $P < 0.001$). The 25-OH-vitamin D levels were insufficient in the sample as a whole ($n=26$, 28 ± 13 ng/mL) and in the PC (25 ± 7 ng/mL), but without significant difference between the groups (Mann-Whitney u test, $P = 0.23$). The results of BMD (L1-L4, femoral neck and total femur) and all other biochemical tests (calcium, intact PTH, 24-hour

urinary calcium and creatinine) except for PEN (which lacks reference values set by the manufacturer) were normal, and the differences between groups were not significant (Student *t test* and Mann-Whitney *u test*, Table2).

TABLE 2 - BIOCHEMICAL AND BONE DENSITOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION AND COMPARISON BETWEEN THE GROUPS WITH GOOD CONTROL (GC, HbA1c <7%) VERSUS POOR CONTROL (PC, HbA1c > 7%).

		Total (n=26)	HbA1c <7% (n=10)	HbA1c >7% (n=16)	P value
Biochemical tests	FBG (mg/dL)	163.8 ± 74	108 ± 23	198 ± 74	<0.001
	HbA1c (%)	8.1 ± 2.3	5.9 ± 0.8	9.4 ± 1.8	<0.001
	Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.4	9.3 ± 0.4	9.2 ± 0.5	0.53
	Intact PTH(pg/dL)	48.4 ± 19.2	45 ± 19	50 ± 19	0.54
	25(OH) vitamin D (ng/mL)	28 ± 13.1	32 ± 18	25 ± 7	0.23
	Urinary calcium (mg/24h)	206.5 ± 58	210 ± 40	204 ± 67	0.85
	Creatinine (mg/dL)	0.78 ± 0.09	0.82 ± 0.1	0.77 ± 0.8	0.2
	Pentosidine (pmol/mL)	3275 ± 1737	3335 ± 1693	3238 ± 1818	0.89
	IGF-1 (ng/mL)	427.5 ± 171	426.1 ± 246.8	428.3 ± 111.8	0.98
Bone mineral density	L1-L4 spine (g/cm ²)	1.331 ± 0.152	1.369 ± 0.145	1.307 ± 0.155	0.32
	Femoral neck (g/cm ²)	1.066 ± 0.0963	1.074 ± 0.112	1.061 ± 0.088	0.73
	Total femur (g/cm ²)	1.197 ± 0.101	1.212 ± 0.117	1.188 ± 0.093	0.57

Abbreviation: FBG – fasting blood glucose

When comparing structural, static, and dynamic parameters of BH data between the groups GC and PC, we observed that O.Th (P = 0.02) and OS/BS (P = 0.05) were significantly decreased in the PC group, and no significant difference to BV/TV (P = 0.18), Tb.Th (P = 0.26), Tb.Sp (P = 0.27), Tb.N (P = 0.69), BFR (P = 0.47), MS/BS (P = 0.13) and MAR (P = 0.70) (Student *t test* and Mann-Whitney *u test*, Table 3).

TABLE 3 - STRUCTURAL, STATIC, AND DYNAMIC HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF BONE FORMATION IN THE STUDY POPULATION AND COMPARISON BETWEEN THE GROUPS WITH GOOD CONTROL (HbA1c < 7%) VERSUS POOR CONTROL (HbA1c > 7%)

		Total (n=26)	HbA1c <7% (n = 10)	HbA1c >7% (n = 16)	P value
Histomorphometric features	BV/TV (%)	27.4 ± 5.15	29.16 ± 4.7	26.3 ± 5.3	0.18
	Tb.Th (µm)	133.9 ± 22.3	140.3 ± 26.33	130 ± 19.3	0.26
	Tb.Sp (µm)	360.3 ± 78.5	338.6 ± 42.3	374 ± 93.1	0.27

	Tb.N (n/mm)	2.06 ± 0.28	2.106 ± 0.24	2.04 ± 0.32	0.69
	O.Th (µm)	9.14 ± 5.31	12.04 ± 5.5	7.34 ± 4.5	0.02
	OS/BS (%)	7.10 ± 8.24	11.94 ± 11.1	4.1 ± 3.76	0.05
	BFR (µm ³ /µm ² /d)	0.015 ± 0.02	0.019 ± 0.02	0.012 ± 0.02	0.47
	MS/BS (%)	2.50 ± 3.05	3.53 ± 3.9	1.87 ± 2.3	0.13
	MAR (µm/day)	0.521 ± 0.22	0.544 ± 0.186	0.508 ± 0.248	0.70

Abbreviations: BV/TV - bone volume; Tb.Th – trabecular thickness; Tb.Sp - trabecular separation; Tb.N - trabecular number; O.Th - osteoid thickness; OS/BS - osteoid surface; BFR - bone formation rate; MS/BS - mineralizing surface; MAR - mineral apposition rate.

Table 4 (Student *t* test and Mann-Whitney *u* test) shows a comparison of structural and static parameters of remodeling in the CG and diabetes groups (GC and PC). In general, BV/TV was higher in the GC ($P < 0.001$) and PC ($P = 0.05$) compared with the CG, while parameters of bone formation were lower in the PC group ($P = 0.03$) compared with the CG.

TABLE 4 - STRUCTURAL AND STATIC HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF BONE FORMATION IN THE CONTROL GROUP (CG) COMPARED WITH THE GROUPS WITH GOOD CONTROL (HbA1c < 7%) AND POOR CONTROL (HbA1c > 7%)

		Control Group (n=15)	HbA1c <7% (n=10)	P value	HbA1c >7% (n=16)	P value
	Age (years)	41.1 ± 5.2	42 ± 4.9	0.68	41.4 ± 4.6	0.86
Histomorphometric features	BV/TV (%)	21.12 ± 8.3	29.16 ± 4.7	<0.001	26.3 ± 5.3	0.05
	Tb.Th (µm)	122.8 ± 28.0	140.3 ± 26.33	0.13	130 ± 19.3	0.41
	Tb.Sp (µm)	520.2 ± 210	338.6 ± 42.3	<0.001	374 ± 93.1	0.04
	Tb.N (n/mm)	1.67 ± 0.49	2.106 ± 0.24	0.02	2.04 ± 0.32	0.03
	O.Th (µm)	10.84 ± 4.3	12.04 ± 5.5	0.51	7.34 ± 4.5	0.03
	OS/BS (%)	9.16 ± 11.2	11.94 ± 11.1	0.54	4.1 ± 3.76	0.08

Abbreviations: BV/TV - bone volume; Tb.Th – trabecular thickness; Tb.Sp - trabecular separation; Tb.N - trabecular number; O.Th - osteoid thickness; OS/BS - osteoid surface; BFR - bone formation rate; MS/BS - mineralizing surface; MAR - mineral apposition rate.

Clinically, some data from patients in the W/CCs group suggest that they have a more severe disease because they have higher levels of HbA1c (Mann-Whitney *u* test, $P = 0.003$, Table 5) and because insulin use

was significantly higher (Fischer Exact Test, $P = 0.01$). The mean time duration of disease was increased in the W/CCs group, but the difference was not significant (Mann-Whitney u test, $P = 0.38$, Table 5). Comparing the groups with and without CCs, we observed no difference in structural BH parameters (Table 5). On the other hand, with the exception of MAR ($P = 0.18$), all static and dynamic BH parameters – *i.e.*, O.Th ($P = 0.03$), OS/BS ($P = 0.01$), BFR ($P = 0.01$), and MS/BS ($P = 0.01$) – were significantly decreased in the group with CCs when compared with the group without CCs (Student t test and Mann-Whitney u test, Table 5).

TABLE 5 - COMPARISON OF STRUCTURAL, STATIC, AND DYNAMIC HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF BONE FORMATION BETWEEN THE GROUPS WITH CHRONIC COMPLICATIONS (W/CC) AND WITHOUT CHRONIC COMPLICATIONS (Wo/CC)

		Total (n=26)	Wo/CC (n=17)	W/CC (n=9)	P value
	Age	41.6 ± 4.6	41.5 ± 5.1	41.7 ± 3.9	0.92
	Disease duration (years)	9.5 ± 5.4	8.8 ± 5.5	11.1 ± 5.4	0.38
Histomorphometric features	BV/TV (%)	27.4 ± 5.15	27.9 ± 4.8	26.4 ± 5.8	0.50
	Tb.Th (µm)	133.9 ± 22.3	140 ± 22.7	122.7 ± 17.5	0.06
	Tb.Sp (µm)	360.3 ± 78.5	363.4 ± 7.3	354.6 ± 96.6	0.53
	Tb.N (n/mm)	2.06 ± 0.28	2.02 ± 0.26	2.14 ± 0.34	0.16
	O.Th (µm)	9.14 ± 5.31	10.8 ± 5.2	6.04 ± 4.15	0.03
	OS/BS (%)	7.10 ± 8.24	9.4 ± 9.3	2.8 ± 2.6	0.01
	BFR (µm ³ /µm ² /d)	0.0149 ± 0.020	0.0205 ± 0.0234	0.0045 ± 0.0045	0.01
	MS/BS (%)	2.50 ± 3.05	3.41 ± 3.45	0.80 ± 0.49	0.01
	MAR (µm/day)	0.521 ± 0.22	0.56 ± 0.19	0.44 ± 0.26	0.18

Abbreviations: BV/TV - bone volume; Tb.Th – trabecular thickness; Tb.Sp - trabecular separation; Tb.N - trabecular number; O.Th - osteoid thickness; OS/BS - osteoid surface; BFR - bone formation rate; MS/BS - mineralizing surface; MAR - mineral apposition rate.

Table 6 (Student t test and Mann-Whitney u test) shows a comparison of structural and static BH parameters between the CG and the groups with and without CCs. BV/TV was increased in the group without CCs ($P = 0.01$) and similar in the group with CCs ($P = 0.11$) compared with the CG. The remodeling static parameter O.Th was decreased in the group with CCs ($P = 0.01$) and similar in the group without CCs ($P = 0.98$), compared with the CG.

TABLE 6 - STRUCTURAL AND STATIC HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF BONE FORMATION IN THE CONTROL GROUP (CG) COMPARED WITH THE GROUPS WITH CHRONIC COMPLICATIONS (W/CC) AND WITHOUT CHRONIC COMPLICATIONS (Wo/CC)

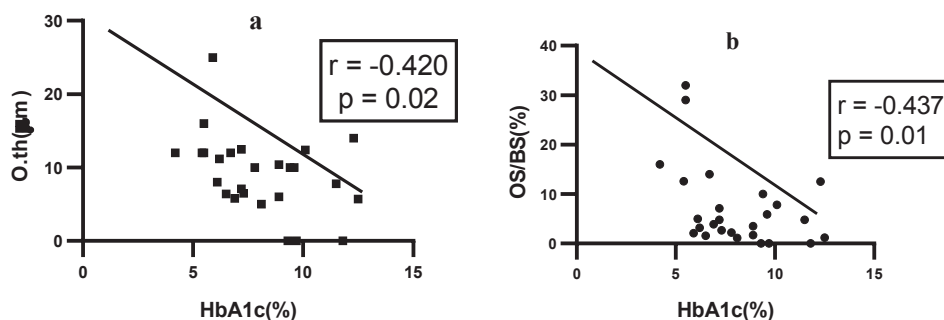
		Control Group (n=15)	Wo/CC (n=17)	P value	W/CC (n=9)	P value
BH parameters	BV/TV(%)	21.12 ± 8.3	27.9 ± 4.8	0.01	26.4 ± 5.8	0
	Tb.Th(μm)	122.8 ± 28.0	140 ± 22.7	0.07	122.7 ± 17.5	0
	Tb.Sp (μm)	520.2 ± 210	363.4 ± 7.3	0.03	354.6 ± 96.6	0.04
	Tb.N (n/mm)	1.67 ± 0.49	2.02 ± 0.26	0.02	2.14 ± 0.34	0.02
	O.Th (μm)	10.84 ± 4.3	10.8 ± 5.2	0.98	6.04 ± 4.15	0.01
	OS/BS (%)	9.16 ± 11.2	9.4 ± 9.3	0.95	2.8 ± 2.6	0

Abbreviations: BV/TV - bone volume; Tb.Th – trabecular thickness; Tb.Sp - trabecular separation; Tb.N - trabecular number; O.Th - osteoid thickness; OS/BS - osteoid surface.

No correlation was found between vitamin D status (deficient, insufficient or sufficient) and BH parameters. There is no significant relationship between the use of metformin and sulfonylurea with the BH parameters, according to the Spearman correlation. However, according to Spearman's correlation test, a positive correlation was observed between PEN and BMD L1-L4 spine ($r = 0.422$, $P = 0.03$), PEN and Z-score L1-L4 spine ($r = 0.597$, $P = 0.001$) and PEN and Z-score of femoral neck ($r = 0.518$, $P = 0.007$).

We found a negative Spearman's correlation between HbA1c values and the static histomorphometric parameters of bone formation O.Th ($P = 0.02$, Figure 1a) and OS/BS ($P = 0.01$, Figure 1b) and no correlation between IGF-1 and any BH parameters.

FIGURE 1 – A NEGATIVE SPEARMAN'S CORRELATION WAS OBSERVED BETWEEN OSTEOID THICKNESS (O.Th) AND HbA1c VALUES (FIGURE 1-a) AND OSTEOID SURFACE (OS/BS) AND HbA1c VALUES (FIGURE 1-b)



4. DISCUSSION

The present study is the first histomorphometric analysis of premenopausal women with T2DM evaluating the effects of glycemic control on structural parameters and static and dynamic parameters of bone remodeling.

We observed that women with diabetes had increased BV/TV and Tb.N values compared with normal women, in addition to decreased Tb.Sp values, suggesting a more robust bone microstructure. This is aligned with findings from studies evaluating volumetric BMD by HR-pQCT in this population (30,31). These data are also consistent with studies demonstrating that patients with diabetes have increased BMD values compared with the normal population, which can be attributed to their increased BMI (32) and hyperinsulinemia (33), usually observed early in the disease. Of note, insulin is considered to be a stimulating factor for osteoblastogenesis and increased bone formation (34).

Osteoid thickness (O.Th), a static histomorphometric parameter of osteoblastic activity, was only reduced in women with poorly controlled diabetes when compared with women in the CG. These findings are consistent with the few studies of BH in diabetes, which show this to be a low remodeling disease (19,20,22). This status of low bone turnover has also been observed in studies with bone turnover markers (BTMs) (10) and may be related to several factors, such as increased AGEs (which can reduce the development, function, and adhesion of osteoblasts to the collagen matrix) (35), elevated sclerostin levels (6), and reduced IGF-1 levels (7–9). In the present study, we observed no significant differences in IGF-1 and PEN levels between the GC and PC groups. An interesting finding was that the osteoid component was reduced in the group with worse glycemic control, indicating impaired osteoblastic function associated with hyperglycemia, and suggesting that toxicity from hyperglycemia affects osteoblastic activity and, consequently, bone quality. The negative correlation between HbA1c levels and parameters of osteoid production confirms this finding. Thus, the possibility that poor glucose control may rapidly trigger the changes demonstrated here, whereas optimal glucose control mitigates these complications, seems to be a plausible speculation, as demonstrated in *in vitro* studies (36).

The original animal model of microangiopathy in mice with type 1 diabetes mellitus demonstrates profound changes in bone marrow, including basal membrane thickening, capillary rarefaction, and apoptosis, which are characteristics similar to other typical diabetic microvascular complications, in addition to depletion of hematopoietic components and fatty degeneration (37). Radial and tibial HR-pQCT studies in patients with T2DM have shown changes in microstructure and resistance in cortical bone, sparing trabecular bone; they appear to be related to the presence of microvascular complications, and not necessarily to T2DM *per se* (38).

Accordingly, when we compared patients with and without CCs in the present study, we observed a significant change in several parameters of bone formation, both static and dynamic ones. Regarding the CG, osteoid thickness (O.Th) was reduced in the group with CCs. These findings may indicate that diabetic bone disease progresses in a continuum that reaches a stage of greater severity with the emergence of microvascular complications of diabetes, when it also then impairs dynamic mineralization parameters. The pathophysiology of bone abnormalities related to microangiopathy is unknown and may be related to an abnormal blood flow leading to ischemia and altered bone remodeling, changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling, and AGE accumulation, directly affecting bone cells or bone tissue properties due to deposition on bone collagen or indirectly causing vascular damage (38,39). Our study was not able to show correlation between PEN and BH. It could be explained by small study sample size and the fact that PEN is not the most abundant AGE of the skeleton (<1%)(40), even though it is the most studied one. However, according to Spearman's correlation test, a positive correlation was observed between PEN and BMD L1-L4 spine, Z-score L1-L4 spine, and Z-score of femoral neck. Increased bone mineralization related to PEN accumulation may be associated with a reduction in the elastic modulus of bone and increased bone fragility (41).

The main weaknesses that could limit the external validity of this study include the design (cross-sectional study), the small sample size, and the exclusively female population. Additionally, the unavailability of anthropometric data in the CG (cadaveric samples) prevented in this group the calculation of the BMI, a parameter that may influence structural BH indexes. The main strengths of the study were the selection of a series of young, metabolically healthy women not biased by the occurrence of hypoestrogenism, and the fact that these women were further divided into two well-defined groups according to glycemic control.

In conclusion, premenopausal women with T2DM presented increased bone volume compared with women without T2DM. Also, patients with PC had reduced static parameters of bone formation compared with patients with GC; these parameters showed no correlation with serum PEN or IGF-1 levels, but correlated negatively with HbA1c levels. Additionally, the presence of CCs was associated with bone disease of greater severity with a reduction in static and dynamic parameters of bone formation and mineralization. All these factors contribute to reduced bone quality and may justify an increased risk of fractures in patients with T2DM, bearing in mind that BMD measured by DXA may be normal and therefore falsely reflect a good bone quality, adequate bone strength and consequently low risk of fractures in this population.

Acknowledgments

We would like to thank the biochemist Dr. Renato Mitsunori Nishihara, PhD, for his valuable suggestions on how to perform the serum assays (ELISA), the nurse Amanda Iseid Labres for collecting and storing the serum samples, and the professor Dr Solena Kusma, PhD, for her valuable suggestions on work's statistical analysis.

5. REFERENCES

1. **Vestergaard P.** Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes - A meta-analysis. *Osteoporos. Int.* 2007;18(4):427–444.
2. **Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB.** Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am. J. Epidemiol.* 2007;166(5):495–505.
3. **Miao J, Brismar K, Nyrén O, Ugargh-Morawski A, Ye W.** Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care* 2005.
4. **Bonds DE, Larson JC, Schwartz A V., Strotmeyer ES, Robbins J, Rodriguez BL, Johnson KC, Margolis KL.** Risk of Fracture in Women with Type 2 Diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(9):3404–3410.
5. **Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, Yu Q, Zillikens MC, Gao X, Rivadeneira F.** Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Epidemiol* 2012. doi:10.1007/s10654-012-9674-x.
6. **García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Salcedo JA, Muñoz-Torres M.** Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(1):234–241.
7. **Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T.** Serum insulin-like growth factor-I is a marker for assessing the severity of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos. Int.* 2011;22(4):1191–1198.
8. **Kanazawa I.** Assessment using serum insulin-like growth factor-I and bone mineral density is useful for detecting prevalent vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. 2018.
9. **Ardawi MSM, Akhbar DH, AlShaikh A, Ahmed MM, Qari MH, Rouzi AA, Ali AY, Abdulrafee AA, Saeda MY.** Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone* 2013;56(2):355–362.
10. **Hygum K, Starup-Linde J, Harsløf T, Vestergaard P, Langdahl BL.** Diabetes mellitus, a state of low bone turnover-a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* 2017;176(3):R137–R157.
11. **Yamagishi S, Nakamura N.** *Mol. Med.* 2015;21(Suppl 1):1.
12. **Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T.** Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycoxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J. Bone Miner. Metab.* 2008;26(1):93–100.
13. **Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T.** Serum Pentosidine Levels Are Positively Associated with the Presence of Vertebral Fractures in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(3):1013–1019.
14. **Iki M, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Tachiki T, Tamaki J, Winzenrieth R, Sato Y, Moon JS, Okamoto N, Kurumatani N.** Hyperglycemia is associated with increased bone mineral density and

decreased trabecular bone score in elderly Japanese men: The Fujiwara-kyo osteoporosis risk in men (FORMEN) study. *Bone* 2017;105:18–25.

15. **Deandrea S, Lucenteforte E, Bravi F, Foschi R, La Vecchia C, Negri E.** Risk factors for falls in community-dwelling older people: A systematic review and meta-analysis. *Epidemiology* 2010;21(5):658–668.
16. **Rubin MR.** Skeletal fragility in diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2017;1402(1):18–30.
17. **Kim TY, Schafer AL.** Diabetes and Bone Marrow Adiposity. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2016;14(6):337–344.
18. **Wu K, Schubeck KE, Frost HM, Villanueva A.** Haversian bone formation rates determined by a new method in a mastodon, and in human diabetes mellitus and osteoporosis. *Calcif. Tissue Res.* 1970;6(1):204–219.
19. **Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Sudhaker Rao D, Whitehouse FW, Michael Parfitt A.** Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995;44(7):775–782.
20. **Leite Duarte ME, da Silva RD.** Histomorphometric analysis of the bone tissue in patients with non-insulin-dependent diabetes (DMNID). *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo.* 1996.
21. **Armas LAG, Akhter MP, Drincic A, Recker RR.** Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bone* 2012;50(1):91–96.
22. **Manavalan JS, Cremers S, Dempster DW, Zhou H, Dworakowski E, Kode A, Kousteni S, Rubin MR.** Circulating Osteogenic Precursor Cells in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(9):3240–3250.
23. **Radominski SC, Bernardo W, Paula AP de, Albergaria BH, Moreira C, Fernandes CE, Castro CHM, Zerbini CA de F, Domiciano DS, Mendonça LMC, Pompei L de M, Bezerra MC, Loures MAR, Wender MCO, Lazaretti- Castro M, Pereira RMR, Maeda SS, Szejnfeld VL, Borba VZC.** Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós- menopausa. *Rev. Bras. Reumatol.* 2017;57(x x):452–466.
24. **Pereira GAP, Genaro PS, Pinheiro MM, Szejnfeld VL, Martini LA.** Dietary calcium - Strategies to optimize intake. *Rev. Bras. Reumatol.* 2009;49(2):161–180.
25. **Recker RR, Kimmel DB, Parfitt MA, Davies MK, Keshawarz N, Hinders S.** Static and tetracycline- based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J. Bone Miner. Res.* 1988;3(2):133–144.
26. **Kimmel DB, Zhou H, Kulak CA, Bilezikian JP, Jorgetti V, dos Reis LM, Rabelo LM, Liu XS, Kulak J, Boguszewski CL, Dempster DW, Guo XE, Borba VC.** Skeletal microstructural abnormalities in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25(9):1931–1940.
27. **Lindsay R, Forese L, Nieves J, Luckey M, Meier D, Liang X, Morgan D, Parisien M, Cosman F, Shen V, Schnitzer M, Dempster DW.** Histomorphometric Assessment of Bone Mass, Structure, and Remodeling: A Comparison Between Healthy Black and White Premenopausal Women. *J. Bone Miner. Res.* 2006;12(6):948–957.
28. **Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM.** Standardized nomenclature, symbols, and units for bone

- histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 2013;28(1):2–17.
29. **Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PHS, Carvalho AB, Jorgetti V.** Brazilian normal static bone histomorphometry: Effects of age, sex, and race. *J. Bone Miner. Metab.* 2007;25(6):400–406.
 30. **Burghardt AJ, Issever AS, Schwartz A V., Davis KA, Masharani U, Majumdar S, Link TM.** High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(11):5045–5055.
 31. **Waard EAC De, Jong JJA De, Koster A, Savelberg HHCM, Geel TA Van, Houben AJHM.** The association between diabetes status , HbA1c , diabetes duration , microvascular disease , and bone quality of the distal radius and tibia as measured with high-resolution peripheral quantitative computed tomography — The Maastricht Study. 2018.
 32. **Shanbhogue V V., Mitchell DM, Rosen CJ, Bouxsein ML.** Type 2 diabetes and the skeleton: New insights into sweet bones. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(2):159–173.
 33. **Newman AB, Strotmeyer ES, Resnick HE, Cauley JA, Harris TB, Nevitt MC, Tylavsky FA, de Rekeneire N, Zmuda JM, Bauer DC, Schwartz A V.** Diabetes Is Associated Independently of Body Composition With BMD and Bone Volume in Older White and Black Men and Women: The Health, Aging, and Body Composition Study. *J. Bone Miner. Res.* 2006;19(7):1084–1091.
 34. **Jick SS, Meier C, Vavanikunnel J, Charlier S, Schneider C, Meier CR, Becker C.** Association between glycemic control and risk of fracture in diabetic patients: A nested case-control study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018. doi:10.1210/jc.2018-01879.
 35. **Leslie WD, Rubin MR, Schwartz A V., Kanis JA.** Type 2 diabetes and bone. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27(11):2231–2237.
 36. **Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, Otani S.** Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* 1998;22(1):17–23.
 37. **Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, Katare RG, Caporali A, Buul JD Van, Prezioso L, Emanuelli C, Madeddu P.** Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 2013;30(3):498–508.
 38. **Shanbhogue V V., Hansen S, Frost M, Brixen K, Hermann AP.** Bone disease in diabetes: another manifestation of microvascular disease? *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(10):827–838.
 39. **Fajardo RJ.** Is Diabetic Skeletal Fragility Associated with Microvascular Complications in Bone? *Curr. Osteoporos. Rep.* 2017;15(1):1–8.
 40. **Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW.** Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose: Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J. Biol. Chem.* 1991;266(18):11654–11660.
 41. **Farlay D, Armas LAG, Gineyts E, Akhter MP, Recker RR, Boivin G.** Nonenzymatic Glycation and Degree of Mineralization Are Higher in Bone from Fractured Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Bone Miner. Res.* 2016;31(1):190–195.

4.1.2 SEGUNDO ARTIGO

Bone Fragility in Premenopausal Patients with Type 2 Diabetes Mellitus And Its Correlation With Bone Volume And Osteoblastic Function: A Cross-Sectional Study

Vicente F.C. Andrade¹, MD, Domingos C. Chula², MD, Fábio P. Sabbag³, PhD, Daniel D. da S. Cavalheiro⁴, MD, Lorena Bávía⁵, PhD, Altair Rogério Ambrósio⁵, MSc, Solena Kusma⁶, PhD, Luciene M. dos Reis⁷, PhD, Victória Z.C. Borba¹, MD, PhD, Carolina Aguiar Moreira¹, MD, PhD

Authors' Affiliation

1 Endocrine Division (SEMPR), Department of Internal Medicine, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil; Carolina Aguiar Moreira, e-mail: carolina.aguiar.moreira@gmail.com; Victória Z.C. Borba: e-mail, vzcborba@gmail.com

2 Nephrology Unit, Clinics Hospital of Federal University of Parana, Brazil, e-mail: domingoschula@gmail.com

3 Ophthalmologist, retinal and vitreo specialist at de Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University, Brazil, e-mail: drfabiosabbag@gmail.com

4 Radiologist at the Advanced Diagnostic Imaging (DAPI) radiology clinic, Curitiba, Paraná, and Master of the Postgraduate Program in Internal Medicine of the Federal University of Parana, e-mail: mr.cavalheiro@gmail.com

5 Laboratory of Molecular Immunopathology, postgraduate program in Internal Medicine and Health Sciences, Clinics Hospital of Federal do Parana University, Brazil; Lorena Bavia, e-mail: lorena.bavia@gmail.com; Altair Rogério Ambrósio, e-mail: altairambrosio@gmail.com

6 Professor of Biostatistics of the Postgraduate Program in Internal Medicine and of Department of Collective Health of Federal University of Parana, e-mail: solenakusma@gmail.com

7 LIM 16 - Laboratório de Fisiopatologia Renal, Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brasil, e-mail: lucienem@usp.br

Corresponding Author

Vicente Florentino Castaldo Andrade

vicente.andrade@hc.ufpr.br; vfca@terra.com.br

SEMPR

Rua Agostinho de Leão Jr, nº 285, CEP: 80030-110, Curitiba-PR, Brazil

Acknowledgements

Thanks to bioquimist Dr. Renato Mitsunori Nishihara for the valuable suggestions on how to performe the serum assays (ELISA) and nurse Amanda Iseid Labres for the collection and storage of serum samples. **SUMMARY**

The study evaluated bone histomorphometry (BH) in 26 premenopausal women with type 2 diabetes (T2DM) with and without vertebral fracture (VF). Premenopausal women with T2DM have a high prevalence of VF (11.5%). Bone fragility in DM2 appears to be characterized by a reduction in the structural parameters of BH and osteoblastic activity.

ABSTRACT

Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with an increased risk of fractures. Little is known about changes in bone histomorphometry (BH) in premenopausal women with T2DM. The aim of the present study is to evaluate BH in premenopausal women with T2DM, correlating it with the presence of vertebral fracture (VF), serum pentosidine (PEN), IGF-1 levels and bone mineral densitometry (BMD).

Methods: This is a cross-sectional study where twenty-six premenopausal women who underwent to bone biopsy were divided into two groups, with and without VF. They were compared with two different controls groups: one historic control (CG, n=15) for BH parameters and other comprised by young healthy women (HC, n=13), for BMD, PEN and IGF1.

Results: Prevalence of VF was 11.5% of the women with T2DM (3/26). Comparison between the groups with and without VF showed that thickness (O.Th) and osteoid surface (OS/BS) were lower in the VF group. Comparison between the groups with and without VF with CG showed static parameters of bone formation (O.Th, OS/BS) were lower in the VF group and the structural parameters (bone volume, BV/TV; trabecular number, Tb.N) were higher only in the without VF group. In the comparison with HC, PEN and BMD were higher in women with T2DM.

Conclusion: Premenopausal patients with T2DM present a high prevalence of morphometric spine fractures. Bone disease in T2DM appears to be a continuum in which the most severe endpoint is characterized by a reduction in the structural parameters in addition to a probable decrease of osteoblastic function. High BMD underestimates the risk of fractures in this population.

KEYWORDS: Type 2 diabetes mellitus bone disease, bone histomorfometry, vertebral fractures, bone quality, pentosidine.

1. INTRODUCTION

Osteoporosis has been reported as a chronic complication of diabetes mellitus (1–4). However, in type 2 diabetes mellitus (T2DM) specifically, bone mineral density (BMD) is increased when compared to nondiabetics (5), suggesting a reduction in bone quality in these patients. The evaluation of the trabecular bone score (TBS) in T2DM corroborates this concept, since it appears to be reduced (6), despite a higher BMD, and the TBS predicted fracture risk better than BMD in one study (7). It is important to emphasize that the increase in fracture risk is also due to the fact that patients with diabetes present a higher risk of falls compared to non-diabetic patients, due to several inherent factors such as the long-term evolution of the disease, hypoglycemia, neuropathy, retinopathy, balance disorders, polypharmacy, and others (1,8,9).

The biological mechanisms through which T2DM acts on the bone may be related to various hormonal and biochemical factors, such as accumulation of the advanced glycosylation end products (AGEs) (10), including pentosidine (PEN); low bone turnover that is occasionally related to sclerostin (ESC) elevation (11,12); and the reduction of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) serum levels. The reduction in IGF-1 levels has been shown to be related to the presence and severity of vertebral fractures (VF) in women with T2DM who are postmenopausal (13–15).

Bone histomorphometry (BH) is the gold-standard technique for the analysis of cortical and trabecular bone remodeling (16) and the few studies performed in patients with DM show a reduction in bone formation (17–19). Two studies evaluated BH in a subgroup of type 1 diabetics (T1DM) with a previous history of low trauma fracture (20,21), one of the studies correlated it with a higher degree of bone mineralization and higher levels of PEN in the trabecular bone (21). There have been no similar published studies in T2DM.

Thus, studies with bone biopsies in patients with T2DM are scarce and the correlation with the presence of VF has not been evaluated. The aim of the present study is to evaluate bone histomorphometry parameters in patients with premenopausal T2DM correlating them with the presence or absence of VF, PEN, IGF-1 and BMD levels.

2. MATERIALS AND METHODS

This study is a cross-sectional, observational, analytical study. Twenty-six patients were divided into 2 groups, according to the presence (with VF) or absence (without VF) of VF, and compared with each other, with the control group (CG) of the BH, and with the control group of healthy women (HC).

A) Patients

Women with T2DM diagnosed at the Endocrinology and Metabology Service of the Federal University of Paraná (SEMPR) were invited to participate in the study. All patients had been using at least one oral

hypoglycemic drug and/or insulin. The inclusion criteria included: diagnosis of T2DM for at least 1 year, age greater than 30 years and less than 50 years, and are premenopausal. Exclusion criteria included secondary causes of osteoporosis, diseases and medications known to interfere with osteomineral metabolism, as well as chronic kidney disease (CKD) with calculated creatinine clearance (based on the equation of the CKD Epidemiology Collaboration [CKD-EPI]) of less than 30 ml/min/1.72 m² body area. The sample was for convenience and all patients were included in the study between 8/30/2016 and 10/17/2017, the month in which data collection was completed. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the Clinics Hospital (HC-UFPR), and all patients signed the informed consent form (ICF).

B) Clinical evaluation

The clinical evaluation included a detailed assessment of lifestyle habits, history of trauma and fractures, questionnaires investigating the daily intake of dietary calcium, habits of programmed physical activity, smoking, and drinking, as well as anthropometric, body mass index (BMI/Quetelet index), and blood pressure measurements were performed.

C) Evaluation of chronic complications (CC)

The presence of CC was evaluated through medical records and complementary tests. Patients were classified as having diabetic retinopathy (yes / no), by retinal specialist (SPF), by serial retinographies documented in photography (DRS - Digital Retinopathy System - Centervue Spa - Italy). When altered, the retinographies were supplemented by fluorescent retinographs (Triton Plus – Topcon - Japan). Regarding diabetic nephropathy, patients were classified as having diabetic nephropathy (yes / no) based on the presence of a urinary albumin / creatinine ratio > 30 mg / g creatinine in a random sample of urine, excluding patients with symptoms of urinary tract infection. Patients were classified in the CC group based on the presence of retinopathy or nephropathy. In total, 9 patients had evidence of CC, with initial diabetic retinopathy in 7 and incipient nephropathy in 3. One had retinopathy and nephropathy.

D) Bone densitometry

BMD was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) measurement in Lunar Prodigy (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) equipped with the enCORE software program at the Bone Metabolism Unit of the SEMPR. The regions evaluated were lumbar spine (LS), femoral neck (FN), and total femur (TFe), in addition to body composition. All tests were performed by the same technician. The value of least significant variance at 95% confidence level, obtained for lumbar spine and total femur, was 0.036 g/cm² and 0.22g/cm², respectively.

E) Biochemical evaluation

The following tests were performed by the Clinical Pathology Laboratory of the Clinics Hospital of UFPR: fasting glycemia [Hexokinase/D-glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD), reference value (VR) <100 mg/dl]; glycated hemoglobin [Enzymatic–National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), VR < 5.8% (International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) = 68 mmol/mol)]; total serum calcium [Arsenazo III, VR = 8.5–10.2 mg/dl]; serum inorganic phosphate [(Phosphomolybdate ultraviolet (UV), VR = 2.3–4.7 mg/dl)]; 25-OH-vitamin D (immuno-lymphoma-MAGLUMI®, VR = deficiency when < 20 ng/ml, insufficiency when < 30 ng/ml, and normal when \geq 30 ng/ml, according to the Endocrine Society classification); albuminuria [turbidimetry assay, VR < 30 mg/g creatinine]; intact parathyroid hormone (PTH) [Chemiluminescence - Chemiflex, VR = 15 to 68 pg/ml]; follicle-stimulating hormone (FSH) [Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), post-menopausal VR-women > 30 mIU/ml]; Estradiol [CMII, CMV, postmenopausal women < 10 pg/mL]. Urine calcium was measured in 24-hour urine [Arsenazo III, VR = 100–250 mg/24 h]. All of the above measurements except 25-OH-vitamin D measurement were performed on the ARCHITECT Analyzer System (Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL, USA).

Serum levels of IGF-1 and pentosidine were performed in duplicate and averaged between values, at the Department of Immunopathology, Clinics Hospital of UFPR and were used for the IGF-1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (ABCA-AB108873; Abcam Plc, Cambridge, UK). According to the manual for the ELISA kit, the intra-assay accuracy is 4.9% and the inter-assay is 9.9%. The reference range is 30–300 ng/ml, and the detection limit is 0.95 ng/ml. For pentosidine, an ELISA kit (CUSA-CSBE9415H; Cusabio Technology LLC, Houston, TX, USA) with an intra-assay precision of < 8% and an inter-assay of < 10% was used. There is no reference range in the kit, but the detection range is 31.25–2000 pmol/ml. The limit of detection is 7.81 pmol/ml.

F) Transiliac bone biopsy

Prior to the bone biopsy, patients received tetracycline as follows: oral tetracycline hydrochloride 500 mg twice daily for 3 days (label 1), followed by a 10-day drug-free interval and a further 3 days of tetracycline hydrochloride 500 mg two times per day (label 2). Three to five days after the last day of label 2 application of the tetracycline hydrochloride, a transiliac bone biopsy of the iliac crest was performed using standard procedures (22)]. The biopsy was performed at the standard site, approximately 2 cm posterior and inferior to the right anterior superior iliac spine, using a Bordier trephine with a serrated border and internal diameter of 7.5

mm to obtain sufficient tissue for analysis. The bone specimens were fixed and dehydrated using standard procedures in the PRO Laboratory of the Pro-Renal Foundation of Curitiba, Brazil (22).

G) Bone histomorphometry

The histomorphometry of the patients was performed by the same investigator (CAM) using a microscope (Nikon Labophot II; Nikon Corp., Tokyo, Japan) with UV capacity, high resolution color digital video camera (Olympus DP71; Olympus Corp., Tokyo, Japan), DrawingBoard VI (GTCO CalComp, Turning Technologies, Inc., Scottsdale, AZ, USA). The image analysis system used was OsteoMeasure (OsteoMetrics, Inc., Decatur, GA, USA). The analysis was carried out at Pro-Renal Foundation, Curitiba, Paraná, Brazil. Structural parameters, such as bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number of trabeculae (Tb.N) and space between trabeculae (Tb.Sp) were measured, as well as static remodeling parameters, such as osteoid thickness (O.Th) and osteoid surface (OS/BS), and the dynamics remodeling parameters, such as mineralization surface (MS/BS), bone formation rate (BFR) and mineral apposition rate (MAR), evaluated as previously described (23). The indices are expressed in accordance with the recommendations of the ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) Nomenclature Committee (24).

H) Histomorphometric Controls (CG)

We used as a control group (CG) for BH a historical control group consisting of 15 postmortem bone biopsies from healthy premenopausal women (13 Caucasian and two black) aged 30 to 50 years, as previously reported (25) [24]. This study followed the standard procedures for performing BH and only evaluated structural and static parameters of bone formation. The data were obtained directly from the authors. To achieve age and race matching of cases and controls, we excluded from the CG those samples from women of ethnic and age groups other than those included in the main study group. The anthropometric data of these patients were not available.

I) Healthy Controls (HC)

Another group of 13 healthy women, 11 Caucasian and 2 black, between 30 and 50 years of age, all premenopausal, and none of whom use drugs that interfere with bone metabolism formed the healthy control (HC) group. They were invited and accepted to participate in the study as HC for PEN, IGF-1, BMD, anthropometric indices, and BMI, but not to the lateral spine x-ray. The sample was for convenience and all women were included in the study between 8/30/2016 and 10/17/2017.

J) Radiological examinations

Patients performed lateral X-ray of the thoracic and lumbar spine, with the focus-film on a distance of 40 inches (102 cm) and the beam of x-ray centered at T8 and L3, respectively. Images were digitalized and analyzed by the same specialist (DDSC), a radiologist, according to the previously described technique (26). This semiquantitative method uses the features of the vertebral form and the degree of vertebral height reduction in the anterior, middle, or posterior vertical dimension to classify the vertebral body as normal (yes or no). In resume, reduction greater than 20% in anterior, middle and/or posterior height in a given vertebra was considered a VF.

K) Statistical analysis

Statistical analysis and graphics were performed using SPSS 23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software, respectively. All continuous variables are presented as mean \pm standard deviation (SD). Fisher's exact test was used to evaluate the categorical variables. The normality of the studied variables was measured by the Shapiro-Wilk test. Student's *t*-test for independent samples was used to compare the means of patients and controls when the normality of the samples was demonstrated, and the Mann-Whitney *U* test was used when the samples were asymmetric. Spearman's correlation coefficients were calculated to evaluate the association between continuous variables. All analyzes used the minimum significance level of $p < 0.05$.

3. RESULTS

Twenty-eight patients signed the informed consent form and were included in the study protocol, but two patients withdrew from the study, therefore the bone biopsy was performed on only the remaining 26. The mean age of the total group was 41.6 ± 4.6 years (Table 1), 3 of 26 patients were black, the mean BMI was 32.4 ± 3.9 kg/m², 9 patients were overweight (34.6%), 11 patients were classified as obesity grade I (42.3%), 5 patients obesity grade II (19.2%) and 1 patient had obesity grade III (3%). Regarding lifestyle habits, 5 patients had a prior or current history of smoking and 4 of alcoholism, 7 patients had scheduled physical activity and the daily calcium intake in the diet was 320 ± 447 mg/24 h, with no difference between groups (Mann-Whitney *U* teste, $P = 0.13$). The most common comorbidities were hypertension (50%), previous history of surgically treated cholecystitis (27%), dyslipidemia (26.9%), nephrolithiasis (11.5%), and hypothyroidism (7.5%). All patients with hypothyroidism had their TSH measured within normal range before performing a bone biopsy. 2 with insulin (7.7%), 6 with sulfonylureas (23%), 23 with metformin (88%), 1 with iDPP4 (3.8%) and 3 with iSGLT2 (11.5%), associated or not with insulin.

Regarding the clinical characteristics of the groups with and without VF, there was no difference between the groups (age, time since diagnosis, ethnicity and BMI), although the mean time since diagnosis was longer in the VF group (Table 1 Mann-Whitney and Fisher's exact test).

TABLE 1 – CLINICAL AND ETHNIC CHARACTERISTICS IN THE STUDY POPULATION AND COMPARISON BETWEEN WITH AND WITHOUT FV GROUPS.

		Total (n=26)	Wo/ FV (n=23)	W/ FV (n=3)	P value
Clinical Aspects	Age (years)	41.6 ± 4.6	41.5 ± 4.8	43 ± 4.4	0.60
	Diagnostic Time (years)	9.5 ± 5.4	9.00 ± 5.6	13.7 ± 1.1	0.11
	Ethnicity (Black / Caucasian)	3/26	3/23	0/3	1.0
	BMI (kg/m ²)	32.4 ± 3.9	32.3 ± 4	32,7 ± 3.9	0.87

BMI, body mass index;

Regarding biochemical tests and BMD (Table 2), there was no significant difference in any of them between the groups with and without VF. Fasting blood glucose and HbA1c levels were higher in the VF group, but without showing statistical significance (Mann-Whitney *U* test, *P* = 0.12 and 0.17, respectively). The 25-OH-vitamin D level was insufficient in both groups and in the sample as a whole, but without significant difference between them (Table 2, Mann-Whitney *U* test, *P* = 0.92). No patient reported falls or previous history of fragility fracture. The prevalence of VF in the total group was 11.5% (3/26), showing differences between groups (Table 2, Fisher's exact test, *P* < 0.001): one patient presented with a single VF (T7), one with two VFs (T6 and T8) and one with 3 VFs (T6, T7 and T8). Nine patients had chronic complications (34.6%), initial diabetic retinopathy in 7, incipient diabetic nephropathy in 3 patients, and one of them had both conditions. The prevalence of microvascular complications was higher in the VF group (Fisher's exact test, *P* = 0.03). Regarding the hypoglycemic drugs used, 11 patients (42%) were using insulin associated with an oral drug, but neither this nor any other therapeutic combination showed any difference in the comparison between the groups without VF and with VF (Fisher's exact test, *P* = 0.11). Two patients were using insulin only (7.7%), 6 with sulfonylureas (23%), 23 with metformin (88%), 1 with iDPP4 (3.8%) and 3 with iSGLT2 (11.5%), associated or not with insulin.

TABLE 2 - BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS, BONE DENSITOMETRY AND PRESENCE OF VERTEBRAL FRACTURE (FV) IN THE STUDY POPULATION AND COMPARISON BETWEEN WITH FV AND WITHOUT FV GROUPS.

		Total (n=26)	Wo/ FV (n=23)	W/ FV (n=3)	P value
Biochemical tests	Fasting Blood Glucose (mg/dl)	163.8 ± 74	155 ± 72	233 ± 68	0.12
	HbA1c (%)	8.1 ± 2.3	7.9 ± 2.2	9.8 ± 2.3	0.17
	PTH intac (pg/ml)	48.4 ± 19.2	50 ± 19	36 ± 14	0.21
	25-OH-Vit. D (ng/ml)	28 ± 13.1	28.3 ± 13.7	25 ± 0.7	0.92
	Pentosidine (pmol/ml)	3275 ± 1737	3152.6 ± 1636	4219.6 ± 2604	0.24
	IGF-1 (ng/ml)	427.5 ± 171	436.1 ± 179.1	361.5 ± 87.6	0.66
	column L1–L4 (g/cm ²)	1.331 ± 0.152	1.323 ± 0.155	1.397 ± 0.127	0.35
BMD	Femoral neck (g/cm ²)	1.066 ± 0.096	1.065 ± 0.102	1.078 ± 0.044	0.77
	Total Hip (g/cm ²)	1.197 ± 0.101	1.193 ± 0.101	1.235 ± 0.120	0.65
Lateral Column	X-ray Vertebral fractures (n/%)	3/11.5%	3/100%	0	< 0.001

VF, vertebral fracture; BMD, bone mineral densitometry;

When comparing the static and dynamic BH data between the groups without VF and with VF, a significant difference was observed for O.Th (osteoid thickness) and OS/BS (osteoid surface), which were reduced in the VF group (Table 3 , Mann-Whitney *U* test, both *P* = 0.04). All other structural and dynamic parameters of BH showed no significant difference between the groups.

TABLE 3 - STRUCTURAL, STATIC AND DYNAMIC PARAMETERS OF THE BONE HISTOMORPHOMETRY (BH) OF THE STUDY POPULATION AND COMPARISON BETWEEN THE WITH VF AND WITHOUT VF GROUPS.

		Total (n=26)	Wo/ VF (n=23)	Wo/ VF (n=3)	P value
BH parameters	BV/TV (%)	27.4 ± 5.15	27.6 ± 5.2	25.6 ± 5.5	0.63
	Tb.Th (µm)	133.9 ± 22.3	135.5 ± 22.3	122.3 ± 22.7	0.28
	Tb.Sp (µm)	360.3 ± 78.5	360.6 ± 81.8	358.6 ± 59.5	0.60
	Tb.N (n/mm)	2.06 ± 0.28	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2	1.0
	O. Th (µm)	9.14 ± 5.31	9.6 ± 5.5	5.6 ± 0.5	0.04
	OS/BS (%)	7.10 ± 8.24	7.9 ± 8.5	1.3 ± 0.3	0.04
	BFR (µm ³ /µm ² /d)	0.0149 ± 0.020	0.0167 ± 0.021	0.0017 ± 0.001	0.11
	MS/BS (%)	2.50 ± 3.05	2.77 ± 3.1	0.47 ± 0.1	0.11
	MAR (µm/day)	0.521 ± 0.22	0.549 ± 0.206	0.310 ± 0.285	0.09

BH, bone histomorphometry; VF, vertebral fracture; BV / TV, bone volume; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.Sp, trabecular separation; Tb.N, number of trabeculae; O.Th, osteoid thickness; OS/BS, osteoid surface; BFR, bone formation rate; MS/BS, mineralization surface; MAR, mineral apposition rate.

Comparison of the structural data of BH between the control group (CG) and the group with VF (Table 4, Mann-Whitney *U* test) showed no significant difference, namely: BV/TV (bone volume, $P = 0.44$).), Tb.Sp (space between trabeculae, $P = 0.14$) and Tb.N (number of trabeculae, $P = 0.12$). When comparing the structural parameters between the CG and the group without VF, bone volume and number of trabeculae were increased in the group without VF ($P = 0.021$ and 0.008 , respectively), whereas Tb.Sp was reduced in this group ($P = 0.016$). Comparison of CG with the groups with and without VF showed a significant difference for static bone formation parameters, in which O.Th (osteoid thickness, $P = 0.038$) and OS/BS (osteoid surface, $P = 0.033$) were reduced only in the group with VF (Table 4).

TABLE 4 - STRUCTURAL AND STATIC PARAMETERS OF THE BONE HISTOMORPHOMETRY (BH) OF THE CONTROL GROUP (GC) COMPARED TO WITHOUT VF AND WITH VF GROUPS.

		CG (n=13)	Wo/ FV (n=23)	P value	W/ FV (n=3)	P value
BH parameters	Age (years)	41.1 ± 5.2	41.5 ± 4.9	0.81	43 ± 4.4	0.63
	BV/TV (%)	21.12 ± 8.3	27.6 ± 5.2	0.021	25.7 ± 5.5	0.44
	Tb.Th (µm)	122.8 ± 28.0	135.5 ± 22.3	0.15	122.3 ± 22.7	0.86
	Tb.Sp (µm)	520.2 ± 210	360.6 ± 81.8	0.016	358.7 ± 59.5	0.14
	Tb.N (n/mm)	1.7 ± 0.5	2.1 ± 0,3	0.008	2.1 ± 0.3	0.12
	O.Th (µm)	10.8 ± 4.3	9.6 ± 5.5	0.72	5.6 ± 0.5	0.038
	OS/BS (%)	9.2 ± 11.2	7.9 ± 8.5	0.65	1.3 ± 0.3	0.033

BH, bone histomorphometry; VF, vertebral fracture; BV/TV, bone volume; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.Sp, trabecular separation; Tb.N, number of trabeculae; O.Th, osteoid thickness; OS/BS, osteoid surface; BFR, bone formation rate; MS/BS, mineralization surface; MAR, mineral apposition rate.

When comparing the anthropometric data, BMD, PEN and IGF-1 between the groups with and without VF with the healthy control group (HC), a difference was observed for BMI, BMD (femoral neck and total femur) and PEN, which were reduced in the HC group (Mann-Whitney *u* test, Table 5).

TABLE 5 - ANTHROPOMETRIC DATA, BMI, BMD, PENTOSIDINE AND IGF-1 OF THE HEALTHY CONTROL (HC) GROUP AND COMPARISON BETWEEN WITH VF AND WITHOUT VF GROUPS

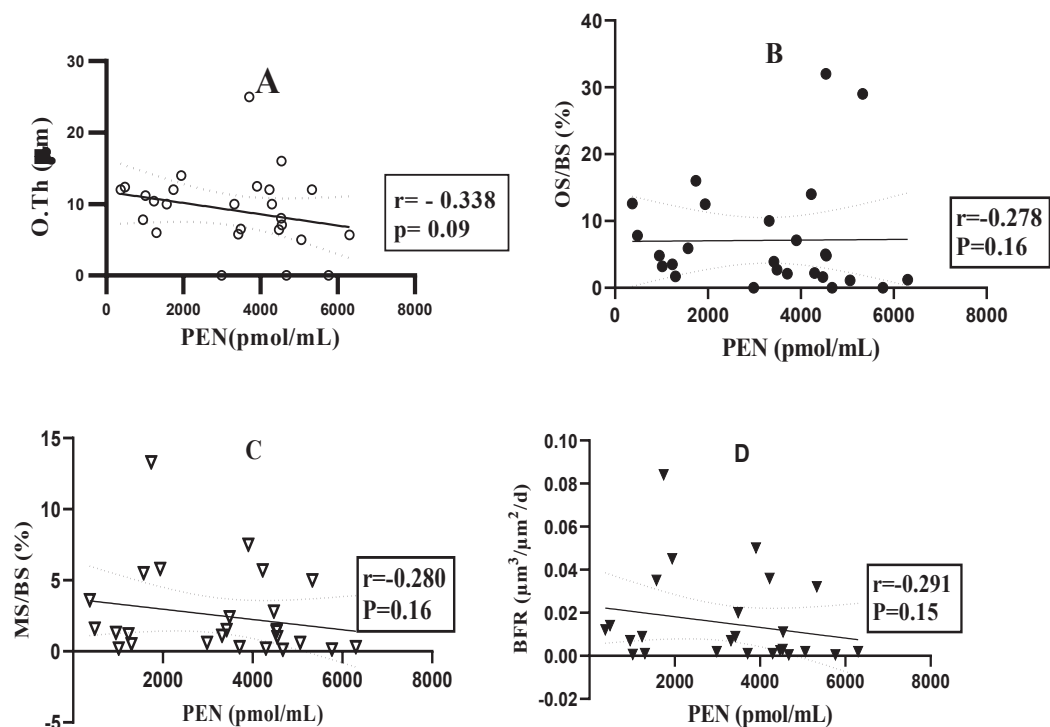
		HC (n=13)	Wo/ VF (n=23)	P value	W/ FV (n=3)	P value
Age (years)		42.5 ± 5.2	41.5 ± 4.8	0.48	43 ± 4.3	0.84

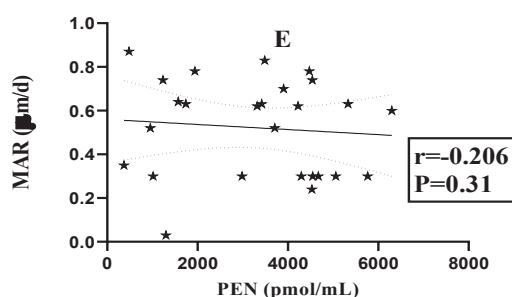
BMD	BMI (kg/m²)	25.1 ± 4.6	32.3 ± 4.0	< 0.001	32.7 ± 3.9	0.03
	Column L1-L4 (g/cm²)	1.261 ± 0.120	1.323 ± 0.160	0.18	1.396 ± 0.127	0.16
	Femoral neck (g/cm²)	0.965 ± 1.140	1.065 ± 0.100	0.02	1.078 ± 0.043	0.07
	Total femur (g/cm²)	1.013 ± 0.120	1.193 ± 0.100	< 0.001	1.235 ± 0.120	0.04
	PEN (pmol/ml)	1230.8 ± 834.0	3152.6 ± 1636	< 0.001	4219.7 ± 2604	0.04
	IGF-1(ng/ml)	426.0 ± 131.7	436.1 ± 179.1	0.78	361.5 ± 87.7	0.55

BMI, body mass index; BMD, bone mineral densitometry; IGF-1, insulin-like growth factor 1; PEN, pentosidine

There was a negative Spearman correlation (Figure 1) between O.Th and PEN (A), OS / BS and PEN (B), MS / BS and PEN (C), BFR and PEN (D) and MAR and PEN without, however, achieving statistical significance for any of them.

FIGURE 1 - SPEARMAN CORRELATIONS BETWEEN PENTOSIDINE AND BH'S STATIC AND DYNAMIC BONE FORMATION PARAMETERS: osteoid thickness (O.TH) [A], osteoid surface (OS / BS) [B], mineralization surface (MS / BS) [C], bone formation rate (BFR) [D], and mineral apposition rate (MAR) [E].





4. DISCUSSION

The present study is the first study in women with T2DM who are premenopausal, young (age = 41.6 ± 4.6 years), and healthy in terms of bone metabolism, which evaluated histomorphometric parameters in the presence of VF and identified signs of lower osteoblastic function and reduction of structural parameters in patients with bone fragility. In addition, a higher concentration of serum PEN may play a role.

Although incipient, the VF group had a higher prevalence of microvascular complications. The presence of chronic complications seems to be related to the increased risk of bone fractures (27–29), often associated with comorbidities and polypharmacy that can lead to higher risk of falls and fractures observed in this population (30).

Although the study involved a young population, a high prevalence of morphometric fractures was seen in the studied sample (11.5%). This is in agreement with studies that used the same methodology described previously (26), where it ranged from 24.5% (13), to 27.9% (31) to 43.3% (32) but with the caveat that most of them involved postmenopausal women. The lower prevalence of VF observed suggests that patients with diabetes have a high premenopausal VF prevalence, possibly with an increase in prevalence with postmenopausal evolution. Alternatively, a recently published meta-analysis that assessed the risk of fractures in DM patients found no significant association between DM and VF (33). However, in at least two of the cohorts involved in this meta-analysis (28,34) the evaluation of VF did not take into account the degree of vertebral deformity, that is, it did not follow the same methodology used here. Thus, it is possible that the prevalence of VF in patients with T2DM observed in these and other studies is underestimated.

When the structural, static, and dynamic parameters of bone formation between the groups with and without VF were compared, greater osteoid thickness (O.Th) and osteoid surface (MS/BS) were observed in the group without VF, which suggests that the osteoblastic activity was reduced in the VF group, regardless of the glycemic control, since the level of HbA1c showed no difference between them. This is in agreement with previous studies on BH in DM that describe a disease of low remodeling (17,18,35). The reduction of

osteoblastic activity in patients with VF may be associated with the higher prevalence of chronic complications observed in this group. A high resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQTC) study in patients with T2DM showed that microstructural and bone resistance changes observed are related to the presence of microvascular complications (36), and not necessarily to T2DM itself (37).

When comparing the structural and static bone formation data of the BH of the CG with the groups with and without VF, it was observed that only the group with VF presented with a reduction of the bone formation parameters (O.Th and OS/BS). Interestingly, compared to the CG, the above group did not show the expected superiority of the structural parameters of BH (BV/TV, Tb.Th and Tb.N) as was expected and was seen in the non-VF group (9,21,38,39), which is the same as that reported in the literature. This suggests that diabetic bone disease presents itself in a continuum in which its most severe endpoint, related to fragility fractures, is associated with the loss of the typical structural parameters of robustness, but still shows an elevated BMD compared to healthy women, causing an underestimation of the risk of fracture in this population (4,5,9).

A number of studies have characterized T2DM as a state of low bone turnover (12), which may be related to several factors, such as increased AGEs, elevated ESC (11) and reduction of the IGF-1 levels (13–15). Our study was not able to show correlation between PEN and BH. It could be explained by small study sample size and the fact that PEN is not the most abundant AGE of the skeleton (<1%) (40), even though it is the most studied one. Furthermore, in the present study no significant difference was observed in IGF-1 and PEN levels between the groups with and without VFs, but serum PEN levels were significantly elevated in both groups compared to healthy women, suggesting an accumulation of this substance in diabetic women, as demonstrated by several studies (9,41). The PEN accumulation can reduce osteoblastic activity, as previously demonstrated (42). In fact, AGEs may reduce the development, function, and adhesion of osteoblasts to matrix collagen (43), reducing bone formation. The accumulation of PEN may be related to a high bone mineralization, which can lead to a reduction of the elasticity modulus, to a less flexible bone, with a tendency to low energy fractures, as demonstrated recently (21,44). All of these elements added together can contribute to poor bone quality.

The main weaknesses of this study are that it is a cross-sectional study, has a small sample size, and a female-only population, all of which limit its external validity. In addition, the unavailability of the anthropometric data of the CG from the cadaver samples prevented the calculation of the BMI, since it could influence the structural indexes of BH. The main strength of the present study was the selection of a series of young, metabolically healthy women without the interference of hypoestrogenism divided into two groups well defined by the ideal glycemic control.

It is concluded that premenopausal T2DM patients present a high prevalence of morphometric spine fractures, a finding that may be underestimated in the literature on the subject due to the use of less sensitive radiological methods in the diagnosis of this condition. Bone disease in T2DM appears to be in a *continuum* in which the most severe endpoint is characterized in the BH by a reduction in the structural parameters in addition to a reduction in the static parameters of bone formation. No relationship was observed between PEN and BH, but levels of this substance were elevated in women with T2DM. All these factors together contribute to reduced bone quality and bone strength, although they are related to high BMD compared to healthy controls, underestimating the risk of fracture in this population.

Compliance with Ethical Standards

Disclosure of potential conflicts of interest: Vicente F.C. Andrade, Domingos C. Chula, Fábio P. Sabbag, Daniel D. da S. Cavalheiro, Lorena Bávia, Altair Rogério Ambrósio, Solena Kusma, Luciene M. dos Reis, Victória Z.C. Borba, and Carolina de Aguiar Moreira declare that they have no competing financial interests.

5. REFERENCES

1. **Bonds DE, Larson JC, Schwartz A V., Strotmeyer ES, Robbins J, Rodriguez BL, Johnson KC, Margolis KL.** Risk of Fracture in Women with Type 2 Diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(9):3404–3410.
2. **Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB.** Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am. J. Epidemiol.* 2007;166(5):495–505.
3. **Miao J, Brismar K, Nyrén O, Ugarph-Morawski A, Ye W.** Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care* 2005.
4. **Vestergaard P.** Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes - A meta-analysis. *Osteoporos. Int.* 2007;18(4):427–444.
5. **Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, Yu Q, Zillikens MC, Gao X, Rivadeneira F.** Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Epidemiol* 2012. doi:10.1007/s10654-012-9674-x.
6. **McCloskey E V., Odén A, Harvey NC, Leslie WD, Hans D, Johansson H, Barkmann R, Boutroy S, Brown J, Chapurlat R, Elders PJM, Fujita Y, Glüer CC, Goltzman D, Iki M, Karlsson M, Kindmark A, Kotowicz M, Kurumatani N, Kwok T, Lamy O, Leung J, Lippuner K, Ljunggren Ö, Lorentzon M, Mellström D, Merlijn T, Oei L, Ohlsson C, Pasco JA, Rivadeneira F, Rosengren B, Sornay-Rendu E, Szulc P, Tamaki J, Kanis JA.** A Meta-Analysis of Trabecular Bone Score in Fracture Risk Prediction and Its Relationship to FRAX. *J. Bone Miner. Res.* 2016;31(5):940–948.
7. **Leslie WD, Aubry-Rozier B, Lamy O, Hans D.** TBS (trabecular bone score) and diabetes-related

- fracture risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(2):602–609.
8. **Deandrea S, Lucenteforte E, Bravi F, Foschi R, La Vecchia C, Negri E.** Risk factors for falls in community-dwelling older people: A systematic review and meta-analysis. *Epidemiology* 2010;21(5):658–668.
 9. **Starr JF, Bandeira LC, Agarwal S, Shah AM, Nishiyama KK, Hu Y, McMahon DJ, Guo XE, Silverberg SJ, Rubin MR.** Robust Trabecular Microstructure in Type 2 Diabetes Revealed by Individual Trabecula Segmentation Analysis of HR-pQCT Images. *J. Bone Miner. Res.* 2018;33(9):1665–1675.
 10. **Yamagishi S, Nakamura N.** <Title/>. *Mol. Med.* 2015;21(Suppl 1):1.
 11. **García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Salcedo JA, Muñoz-Torres M.** Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(1):234–241.
 12. **Hygum K, Starup-Linde J, Harsløf T, Vestergaard P, Langdahl BL.** Diabetes mellitus, a state of low bone turnover-a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* 2017;176(3):R137–R157.
 13. **Ardawi MSM, Akhbar DH, AlShaikh A, Ahmed MM, Qari MH, Rouzi AA, Ali AY, Abdulrafee AA, Saeda MY.** Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone* 2013;56(2):355–362.
 14. **Kanazawa I.** Assessment using serum insulin-like growth factor-I and bone mineral density is useful for detecting prevalent vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. 2018.
 15. **Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T.** Serum insulin-like growth factor-I is a marker for assessing the severity of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos. Int.* 2011;22(4):1191–1198.
 16. **Epstein S, Defeudis G, Manfrini S, Napoli N, Pozzilli P.** Diabetes and disordered bone metabolism (diabetic osteodystrophy): time for recognition. *Osteoporos. Int.* 2016;27(6):1931–1951.
 17. **Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Sudhaker Rao D, Whitehouse FW, Michael Parfitt A.** Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995;44(7):775–782.
 18. **Leite Duarte ME, da Silva RD.** Histomorphometric analysis of the bone tissue in patients with non-insulin-dependent diabetes (DMNID). *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo.* 1996.
 19. **Wu K, Schubeck KE, Frost HM, Villanueva A.** Haversian bone formation rates determined by a new method in a mastodon, and in human diabetes mellitus and osteoporosis. *Calcif. Tissue Res.* 1970;6(1):204–219.
 20. **Armas LAG, Akhter MP, Drincic A, Recker RR.** Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bone* 2012;50(1):91–96.
 21. **Farlay D, Armas LAG, Gineyts E, Akhter MP, Recker RR, Boivin G.** Nonenzymatic Glycation and Degree of Mineralization Are Higher in Bone from Fractured Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Bone Miner. Res.* 2016;31(1):190–195.
 22. **Kimmel DB, Zhou H, Kulak CA, Bilezikian JP, Jorgetti V, dos Reis LM, Rabelo LM, Liu XS, Kulak J, Boguszewski CL, Dempster DW, Guo XE, Borba VC.** Skeletal microstructural abnormalities in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25(9):1931–1940.

23. **Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM.** Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 2013;28(1):2–17.
24. **Lindsay R, Forese L, Nieves J, Luckey M, Meier D, Liang X, Morgan D, Parisien M, Cosman F, Shen V, Schnitzer M, Dempster DW.** Histomorphometric Assessment of Bone Mass, Structure, and Remodeling: A Comparison Between Healthy Black and White Premenopausal Women. *J. Bone Miner. Res.* 2006;12(6):948–957.
25. **Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PHS, Carvalho AB, Jorgetti V.** Brazilian normal static bone histomorphometry: Effects of age, sex, and race. *J. Bone Miner. Metab.* 2007;25(6):400–406.
26. **Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC.** Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J. Bone Miner. Res.* 1993. doi:10.1002/jbmr.5650080915.
27. **Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Peduto AJ.** Diabetes and Risk of Fracture: The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes Care* 2001;24(7):1198–1203.
28. **Melton LJ, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla S.** Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J. Bone Miner. Res.* 2008. doi:10.1359/jbmr.080323.
29. **Strotmeyer ES, Cauley JA, Schwartz A V., Nevitt MC, Resnick HE, Bauer DC, Tylavsky FA, de Rekeneire N, Harris TB, Newman AB.** Nontraumatic Fracture Risk With Diabetes Mellitus and Impaired Fasting Glucose in Older White and Black Adults. *Arch. Intern. Med.* 2005;165(14):1612.
30. **Wallander M, Axelsson KF, Nilsson AG, Lundh D, Lorentzon M.** Type 2 Diabetes and Risk of Hip Fractures and Non-Skeletal Fall Injuries in the Elderly: A Study From the Fractures and Fall Injuries in the Elderly Cohort (FRAILCO). *J. Bone Miner. Res.* 2017;32(3):449–460.
31. **Kilpadi KL, Eldabaje R, Schmitz JE, Ehler B, Thames T a, Joshi a P, Simmons Iii JW, Michalek JE, Fajardo RJ.** Type 2 Diabetes is Associated with Vertebral Fractures in a Sample of Clinic- and Hospital-Based Latinos. *J. Immigr. Minor. Health* 2014;16(3):440–449.
32. **Chung DJ, Choi HJ, Chung YS, Lim SK, Yang SO, Shin CS.** The prevalence and risk factors of vertebral fractures in Korean patients with type 2 diabetes. *J. Bone Miner. Metab.* 2013;31(2):161–168.
33. **Wang H, Ba Y, Xing Q, Du J-L.** Diabetes mellitus and the risk of fractures at specific sites: a meta-analysis. *BMJ Open* 2019;9(1):e024067.
34. **Holmberg AH, Johnell O, Nilsson PM, Nilsson J, Berglund G, Åkesson K.** Risk factors for fragility fracture in middle age. A prospective population-based study of 33,000 men and women. *Osteoporos. Int.* 2006;17(7):1065–1077.
35. **Manavalan JS, Cremers S, Dempster DW, Zhou H, Dworakowski E, Kode A, Kousteni S, Rubin MR.** Circulating Osteogenic Precursor Cells in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(9):3240–3250.
36. **Shanbhogue V V., Hansen S, Frost M, Brixen K, Hermann AP.** Bone disease in diabetes: another manifestation of microvascular disease? *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(10):827–838.
37. **Shanbhogue V V., Hansen S, Frost M, Jørgensen NR, Hermann AP, Henriksen JE, Brixen K.** Compromised cortical bone compartment in type 2 diabetes mellitus patients with microvascular disease.

- Eur. J. Endocrinol.* 2016;174(2):115–124.
38. **Burghardt AJ, Issever AS, Schwartz A V., Davis KA, Masharani U, Majumdar S, Link TM.** High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(11):5045–5055.
 39. **Waard EAC De, Jong JJA De, Koster A, Savelberg HHCM, Geel TA Van, Houben AJHM.** The association between diabetes status , HbA1c , diabetes duration , microvascular disease , and bone quality of the distal radius and tibia as measured with high-resolution peripheral quantitative computed tomography — The Maastricht Study. 2018.
 40. **Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW.** Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose: Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J. Biol. Chem.* 1991;266(18):11654–11660.
 41. **Karim L, Bouxsein ML.** Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. *Bone* 2016;82:21–27.
 42. **Sanguineti R, Storace D, Monacelli F, Federici A, Odetti P.** Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1126:166–172.
 43. **Leslie WD, Rubin MR, Schwartz A V., Kanis JA.** Type 2 diabetes and bone. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27(11):2231–2237.
 44. **Saito M, Kida Y, Kato S, Marumo K.** Diabetes, collagen, and bone quality. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2014;12(2):181–188.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo fixou-se em três parâmetros clínicos principais, correlacionando-os com os níveis séricos de PEN e IGF-1, ao avaliar a HO da sua amostra: a) controle glicêmico, b) presença de CCs e c) presença de FVs.

Nossos resultados podem permitir a elaboração da seguinte narrativa sobre a fisiopatologia e evolução da HO na doença óssea do DM2.

Numa fase precoce, mulheres jovens, com sobrepeso ou obesas, hiperinsulinêmicas, antes ou por volta da idade de aquisição do pico de massa óssea (30 anos de idade), desenvolvem uma estrutura óssea robusta, com volume ósseo, número e espessura de trabéculas elevado. Com o surgimento do DM2, os períodos de descompensação e hiperglicemia, caracterizados laboratorialmente pela elevação da HbA1c, são rapidamente associados a períodos intermitentes, mais ou menos prolongados, de baixa atividade osteoblástica e remodelação óssea. Com a progressão da doença e surgimento de complicações microvasculares, a doença óssea progride, se torna mais grave, afetando também a taxa de formação e mineralização óssea, onde a ESC pode ter um papel importante. O efeito sobre a formação óssea associado ao baixo remodelamento levariam, progressivamente, à perda dos parâmetros de robustez óssea (volume ósseo aumentado) relacionados à resistência insulínica e à hiperinsulinemia, com redução do volume ósseo. Finalmente, embora ainda muito jovens, essas mulheres fraturam. Foi observada uma prevalência de 11,5% de FVs morfométricas nas pacientes com DM2 aqui avaliadas (3/26 pacientes). A redução do volume ósseo, possivelmente associado a um estado de baixa remodelação, excesso de mineralização e perda do módulo elástico causado pelo acúmulo de AGEs, parecem estar relacionados ao desfecho final das fraturas, embora a DMO ainda demonstre elevada densidade óssea aqui observada, quando comparada às mulheres normais da mesma idade. Potencialmente, mais adiante, a menopausa e o hipoestrogenismo podem agravar a perda de massa óssea e a qualidade óssea.

Se a prevenção da doença óssea diabética parece clara, qual seja, a obtenção e a manutenção do controle glicêmico, seu tratamento certamente demandará novos estudos que apontem se estimular ou inibir o remodelamento ósseo é a melhor estratégia para melhorar a qualidade óssea nesta população.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão:

- a) Mulheres na pré-menopausa com DM2 apresentaram aumento do volume ósseo em comparação com mulheres sem DM2.
- b) Pacientes com MC apresentaram menor volume osteoide comparados com pacientes com BC; esses parâmetros não mostraram correlação com os níveis séricos de IGF-1, e se correlacionaram negativamente com os níveis de HbA1c.
- c) A presença de CCs foi associada à doença óssea de maior gravidade, com redução dos parâmetros estáticos e dinâmicos da formação e mineralização óssea.
- d) Os níveis séricos de PEN correlacionaram-se positivamente com a DMO de coluna L1-L4, Z-score de coluna L1-L4 e Z-score de colo femoral.
- e) A prevalência de FV nesta população foi de 11,5% e parece estar associada à redução dos parâmetros estruturais na HO.
- f) Todos esses fatores contribuem para a redução da qualidade óssea e podem justificar um risco aumentado de fraturas em pacientes com DM2, tendo em mente que a DMO medida pela DXA pode refletir falsamente uma boa resistência óssea nessa população.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A. C.; et al. Microstructural and compositional contributions towards the mechanical behavior of aging human bone measured by cyclic and impact reference point indentation. **Bone**, v. 87, p. 37–43, 2016.

ANDRADE, V.F.C. et al. Bone histomorphometry in young patientes with type 2 diabetes is affected by disease control and chronic complications. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, United States, 2019.

ARDAWI, M. S. M.; et al. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 12, p. 2812–2822, 2011.

ARDAWI, M. M. et al. Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. **Bone**, v. 56, n. 2, p. 355–362, 2013.

ARMAS, L. A. G. et al. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 91–96, 2012.

AUTIER, P. et al. Costs induced by hip fractures: a prospective controlled study in Belgium. **Osteoporosis international**, 2000.

BAILEY, A. J. et al. Age-related changes in the biochemical properties of human cancellous bone collagen: relationship to bone strength. **Calcif Tissue Int**, 1999.

BAILEY, Allen J.; PAUL, Robert Gordon; KNOTT, Lynda. **Mechanisms of maturation and ageing of collagen****Mechanisms of Ageing and Development**, 1998.

BANSE, X.; SIMS, T. J.; BAILEY, A. J. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: Correlation with collagen intermolecular cross-links. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 9, p. 1621–1628, 2002.

BONDS, Denise E. et al. Risk of Fracture in Women with Type 2 Diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 9, p. 3404–3410, 2006.

COHEN, A. et al. Increased marrow adiposity in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 8, p. 2782–2791, 2012.

COOPER, C.; FERRARI, F. S.; IOF Board and Executive Committee. IOF Compendium of Osteoporosis. In: COOPER, C.; FERRARI, F. S.; IOF Board and Executive Committee. **International Osteoporosis Foundation (IOF)**, p. 74, 2017.

CREE, M. et al. Mortality and institutionalization following hip fracture. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 48, n. 3, p. 283–288, 2000.

DE LIEFDE, I. I. et al. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 12, p. 1713–1720, 2005.

DEANDREA, S. et al. Risk factors for falls in community-dwelling older people: A systematic review and meta-analysis. **Epidemiology**, v. 21, n. 5, p. 658–668, 2010.

DEMPSTER, David W. Bone microarchitecture and strength. **Osteoporosis International**, [s. l.], v. 14, n. 0, p. 54–56, 2003.

DEMPSTER, D. W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 1, p. 2–17, 2013.

DEPALLE, B. et al. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 52, p. 1–13, 2015.

DONG, X. N. et al. In situ accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs) in

bone matrix and its correlation with osteoclastic bone resorption. **Bone**, [s. l.], 2011.

DOS REIS, L. M. et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: Effects of age, sex, and race. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 400–406, 2007.

EPSTEIN, S. et al. **Diabetes and disordered bone metabolism (diabetic osteodystrophy): time for recognition** *Osteoporosis International*, 2016.

EYRE, D. Cross-Linking in Collagen and Elastin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 717–748, 1984.

FARLAY, Delphine et al. Nonenzymatic Glycation and Degree of Mineralization Are Higher in Bone from Fractured Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 1, p. 190–195, 2016.

FURST, J. R. et al. Advanced glycation endproducts and bone material strength in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 6, p. 2502–2510, 2016.

GARCÍA-MARTÍN, A. et al. Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 1, p. 234–241, 2012.

GARNERO, P. et al. Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: The OFELY prospective study. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2002.

GARNERO, P. The contribution of collagen crosslinks to bone strength. **BoneKey Reports**, 2012.

GENANT, H. K. et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. **Journal of Bone and Mineral Research**, 1993.

GOLD, D. T. The nonskeletal consequences of osteoporotic fractures: physiologic and social outcomes. **North American Journal of Rheumatic Diseases Clinics**, v. 27, n. 1, p. 255–262, 2001.

HALL, S. et al. A Case–Control Study of Quality of Life and Functional Impairment in Women with Long–Standing Vertebral Osteoporotic Fracture. **Osteoporosis International**, v. 9, p. 508–515, 1999.

HOFBAUER, L. C. et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 9, p. 1317–1328, 2007.

HOLM, J. P. et al. Fracture risk in women with type II diabetes. Results from a historical cohort with fracture follow-up. **Endocrine**, v. 60, n. 1, p. 151–158, 2018.

HOLICK, Michael F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.

HUANG, H.; HE, Xi. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 119–125, 2008.

HYGUM, K. et al. Diabetes mellitus, a state of low bone turnover-a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 3, p. R137–R157, 2017.

IKI, M. et al. Hyperglycemia is associated with increased bone mineral density and decreased trabecular bone score in elderly Japanese men: The Fujiwara-kyo osteoporosis risk in men (FORMEN) study. **Bone**, v. 105, p. 18–25, 2017.

IVERS, R. Q. et al. Diabetes and Risk of Fracture: The Blue Mountains Eye Study. In: IVERS, R. Q. et al. **Diabetes Care**, International Diabetes Federation, v. 24, n. 7, p. 1198–1203, 2001.

JANGHORBANI, M. et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus

and risk of fracture. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 5, p. 495–505, 2007.

JICK, S. S. et al. Association between glycemic control and risk of fracture in diabetic patients: A nested case-control study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2018.

KANAZAWA, I. Assessment using serum insulin-like growth factor-I and bone mineral density is useful for detecting prevalent vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus, **Osteoporosis International**, v. 11, p. 2527-2535, 2018.

KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; SUGIMOTO, T. Serum insulin-like growth factor-I is a marker for assessing the severity of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 4, p. 1191–1198, 2011.

KANAZAWA, I. et al. Osteoporosis and vertebral fracture are associated with deterioration of activities of daily living and quality of life in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, 2018.

KARIM, L. et al. Differences in non-enzymatic glycation and collagen cross-links between human cortical and cancellous bone. **Osteoporosis International**, 2013.

KARIM, L.; BOUXSEIN, M. L. **Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties** *Bone*, 2016.

KIEBZAK, G. M. et al. 149 Undertreatment of osteoporosis in men with hip fracture. **Arch Intern Med**, v. 162, n. 19, p. 2217–2222, 2002.

KRAKAUER, J. C. et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. **Diabetes**, v. 44, n. 7, p. 775–782, 1995.

KULAK, C. A. M. et al. Skeletal microstructural abnormalities in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Bone and Mineral**

Research, v. 25, n. 9, p. 1931–1940, 2010.

LEITE DUARTE, M. E.; DA SILVA, R. D. Histomorphometric analysis of the bone tissue in patients with non-insulin-dependent diabetes (DMNID). **Revista do Hospital das Clinicas**, 1996.

LESLIE, W. D. et al. Biphasic fracture risk in diabetes: A population-based study. **Bone**, 2007.

LESLIE, W. D. et al. Type 2 diabetes and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 11, p. 2231–2237, 2012.

LESLIE, W. D. et al. TBS (trabecular bone score) and diabetes-related fracture risk. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 2, p. 602–609, 2013.

LI, X. et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19883–19887, 2005.

LINDSAY, R. et al. Histomorphometric Assessment of Bone Mass, Structure, and Remodeling: A Comparison Between Healthy Black and White Premenopausal Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 6, p. 948–957, 2006.

LIPS, P. et al. Quality of life in patients with vertebral fractures: validation of the Quality of Life Questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO). In: LIPS, P. et al. **Osteoporos Int** . Working Party for Quality of Life of the European Foundation for Osteoporosis, v. 10, n. 2, p. 150–160, 1999.

LIPSCOMBE, L. L. et al. The risk of hip fractures in older individuals with diabetes: A population-based study. **Diabetes Care**, v. 30, n. 4, p. 835–841, 2007.

LOKE, Y. K.; SINGH, S.; FURBERG, C. D. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. **CMAJ**, 2009.

MA, L. et al. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Eur J Epidemiol**, 2012.

MAGAZINER, J. et al. Predictors of functional recovery one year following hospital discharge for hip fracture: a prospective study. **J Gerontol**, 1990.

MCCLOSKEY, E. V. et al. A Meta-Analysis of Trabecular Bone Score in Fracture Risk Prediction and Its Relationship to FRAX. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 5, p. 940–948, 2016.

MELTON, L. J. et al. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, 2008.

MIAO, J. et al. Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. **Diabetes Care**, 2005.

MÖDDER, U. I. et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 373–379, 2011.

MOREIRA, C. A.; DEMPSTER, D. W. Bone histomorphometry in diabetes mellitus. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 11, p. 2559–2560, 2015.

NEVITT, M. C. et al. The association of radiographically detected vertebral fractures with back pain and function: A prospective study. **Annals of Internal Medicine**, 1998.

NUCHE-BERENGUER, B. et al. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. **Regulatory Peptides**, v. 159, n. 1–3, p. 61–66, 2010.

ODETTI, P. et al. Advanced glycation end products and bone loss during aging. **Ann N Y Acad Sci**, 2005.

OSNES, E. K. et al. Consequences of hip fracture on activities of daily life and residential needs. **Osteoporosis International**, v. 15, n. 7, p. 567–574, 2004.

PEREIRA, G. A. P. et al. Dietary calcium - Strategies to optimize intake. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 161–180, 2009.

PORTAL-NÚÑEZ, S. et al. Alterations of the Wnt/ β -catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. **FEBS Letters**, v. 584, n. 14, p. 3095–3100, 2010.

RADOMINSKI, S. C. et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. x x, p. 452–466, 2017.

ROUX, C. et al. Burden of non-hip, non-vertebral fractures on quality of life in postmenopausal women: The Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women (GLOW). **Osteoporosis International**, 2012.

RUBIN, M. R. Skeletal fragility in diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1402, n. 1, p. 18–30, 2017.

SAITO, M. et al. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 10, p. 1514–1523, 2006.

SCHWARTZ, A. V. et al. Pentosidine and Increased Fracture Risk in Older Adults with Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 7, p. 2380–2386, 2009.

SCHWARTZ, A. V. et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 2001.

SCHWARTZ, A. V et al. Association of BMD and FRAX Score with Risk of Fracture in Older Adults with Type 2 Diabetes. **Jama**, v. 305, n. 21, p. 2184–2192, 2012.

SEEMAN, E.; DELMAS, Pierre D. Bone quality--the material and structural basis of

bone strength and fragility. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 21, p. 2250–2261, 2006.

SHIRAKI, M. et al. Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycoxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 93–100, 2008.

SILVA, B. C. et al. Trabecular bone score: A noninvasive analytical method based upon the DXA image. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 518–530, 2014.

SILVERMAN, S .L. et al. Prevalence of depressive symptoms in postmenopausal women with low bone mineral density and/or prevalent vertebral fracture: results from the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) study. **Journal of Rheumatology**, 2007.

STOLNICKI, B.; OLIVEIRA, L. G. For the first fracture to be the last. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 51, n. 2, p. 121–126, 2016.

STROTMEYER, E. S. et al. Nontraumatic Fracture Risk With Diabetes Mellitus and Impaired Fasting Glucose in Older White and Black Adults. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n. 14, p. 1612, 2005.

SUVA, L. J. Sclerostin and the unloading of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 10, p. 1649–1650, 2009.

TAKEUCHI, M. et al. Immunological detection of a novel advanced glycation end-product. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 7, n. 11, p. 783–791, 2001.

TOSTESON, A. N. A. et al. Impact of hip and vertebral fractures on quality-adjusted life years. **Osteoporosis International**, v. 12, n. 12, p. 1042–1049, 2001.

TRAN, T. et al. Population-Wide Impact of Non-Hip Non-Vertebral Fractures on Mortality. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2017.

UELAND, T. **Bone metabolism in relation to alterations in systemic growth hormone Growth Hormone and IGF Research**, 2004.

VALENTINI, A. et al. FRAX tool in type 2 diabetic subjects: the use of HbA1c in estimating fracture risk. **Acta Diabetologica**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.

VAN STAA, T. P. et al. Epidemiology of fractures in England and Wales. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 517–522, 2001.

VASHISHTH, D. Advanced glycation end-products and bone fractures. **IBMS BoneKEy**, 2009.

VESTERGAARD, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes - A meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 4, p. 427–444, 2007.

VIGUET-CARRIN, S. et al. Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. **Bone**, 2006.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. **The role of collagen in bone strengthOsteoporosis International**, 2006.

WALLANDER, M. et al. Type 2 Diabetes and Risk of Hip Fractures and Non-Skeletal Fall Injuries in the Elderly: A Study From the Fractures and Fall Injuries in the Elderly Cohort (FRAILCO). **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 3, p. 449–460, 2017.

WOLFFENBUTTEL, B. H. R.; FOUNDS, W.; BUCALA, Richard. Long-term assessment of glucose measurement by haemoglobin-AGE. **Annals of Internal Medicine**, p. 513–515, 1996.

WU, K. et al. Haversian bone formation rates determined by a new method in a

mastodon, and in human diabetes mellitus and osteoporosis. **Calcified Tissue Research**, v. 6, n. 1, p. 204–219, 1970.

YAMAGISHI, S.; IMAIZUMI, T. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. **Curr Pharm Des**, 2005.

YAMAGISHI, S.; NAKAMURA, N. **Molecular Medicine**, v. 21, n. Suppl 1, p. 1, 2015.

YAMAMOTO, M. et al. Serum Pentosidine Levels Are Positively Associated with the Presence of Vertebral Fractures in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 3, p. 1013–1019, 2008.

YAMAMOTO, M.; SUGIMOTO, T. **Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength** **Current Osteoporosis Reports**, 2016.

APÊNDICE 1 – REGISTRO DA SUBMISSÃO DO PRIMEIRO ARTIGO À REVISTA THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABILISM

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism BONE HISTOMORPHOMETRY IN YOUNG PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES IS AFFECTED BY DISEASE CONTROL AND CHRONIC COMPLICATIONS --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	jc.2019-01170
Article Type:	Clinical Research Article
Full Title:	BONE HISTOMORPHOMETRY IN YOUNG PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES IS AFFECTED BY DISEASE CONTROL AND CHRONIC COMPLICATIONS
Short Title:	BONE HISTOMORPHOMETRY IN YOUNG PATIENTS WITH T2DM
Corresponding Author:	vicente andrade, M.D. Universidade Federal do Paraná Curitiba, Paraná BRAZIL
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Paraná
Order of Authors:	vicente andrade, M.D. Domingos C. Chula Fábio P. Sabbag Daniel D. da S. Cavalheiro Lorena Bávia Altair Rogério Ambrósio Cleber Rafael V. da Costa Luciene M. dos Reis Victória Z. C. Borba Carolina de Aguiar Moreira
Section/Category:	Parathyroid, Bone, and Mineral Metabolism
Manuscript Classifications:	Bone / Mineral Metabolism; Metabolic bone disease; Osteoporosis; Diabetes; Complications, Microvascular; Nephropathy; Retinopathy; Type 2 Diabetes
Keywords:	Type 2 diabetes mellitus, bone disease, bone histomorphometry, vertebral fractures, bone quality, pentosidine.
Abstract:	<p>Context: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with an increased risk of fractures. No study has evaluated the correlation of bone histomorphometry (BH) parameters with glycemic control and presence of chronic complications (CCs) in premenopausal women with T2DM.</p> <p>Objectives: To evaluate BH and correlate them with the degree of glycemic control and presence of CCs.</p> <p>Design, settings and patients: This was a cross-sectional study. Twenty-six premenopausal women with T2DM were divided into groups with HbA1c < 7% (GC, n = 10) and HbA1c > 7% (PC, n = 16), and further subdivided into groups with (n = 9) and without (n = 17) CCs. BH parameters (bone volume [BV/TV], trabecular thickness [Tb.Th], trabecular number [Tb.N], trabecular separation [Tb.Sp], osteoid thickness [O.Th], osteoid surface [OS/BS], mineralizing surface [MS/BS], bone formation rate [BFR], mineral apposition rate [MAR]) as well as serum pentosidine (PEN) and IGF-1 were measured.</p> <p>Results: BV/TV was increased in GC (P = 0.00) and PC (P = 0.05) groups and O.Th (P = 0.03) was smaller in the PC group than CG. A comparison of the groups with and without CCs with the CG showed in the group with CCs, O.Th was smaller (P = 0.01) and BV/TV similar to the CG (P = 0.11). HbA1c correlated negatively with O.Th (P = 0.02) and OS/BS (P = 0.01). No correlation of BH to PEN and IGF-1.</p> <p>Conclusion: BH in premenopausal patients with T2DM is affected by disease control and chronic complications.</p>

Funding Information:	
Author Comments:	DISCLOSURE SUMMARY: I, the designated corresponding author, on behalf of myself and my co-authors, hereby transfer and assign all right, title, and interest, including copyright and any moral rights, in and to the manuscript named in this submission (called the Work hereafter) to the Endocrine Society (ES). If ES ultimately declines to publish the Work in an ES journal, all rights in and to the Work will revert to the author(s).
Suggested Reviewers:	Mishaela R. Rubin, M.D. Professor, Columbia University mrr6@columbiaa.edu Due to her knowledge in the area of bone histomorphometry.
	Elizabeth J. Shane, M.D. Professor, Columbia University es54@cumc.columbia.edu Due to her knowledge in the area of bone histomorphometry.
	Clifford J. Rosen, M.D. Professor, Maine Medical Center cjrofen@gmail.com Due to his knowledge in the area of bone histomorphometry.
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
CELL LINE AUTHENTICATION: I have read and understood the Cell Line Authentication policy and describe my submission as follows:	Not applicable to my manuscript.
STEROID HORMONE MEASUREMENT: I have read and understood the Steroid Hormone Measurement policy and describe my submission as follows:	Not applicable to my manuscript.
PRECIS: The precis is a brief description of your paper that will appear on the Table of Contents underneath your article title, should your paper be accepted (see the current issue of JCEM for examples). The	Premenopausal women with type 2 diabetes mellitus with inadequate glycemic control and chronic complications have lower bone turnover than women with good control and no chronic complications.

APÊNDICE 2 – REGISTRO DA SUBMISSÃO DO SEGUNDO ARTIGO À REVISTA OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL

Osteoporosis International

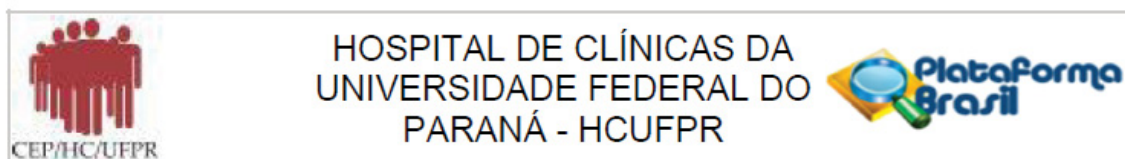
BONE FRAGILITY IN PREMENOPAUSAL PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND ITS CORRELATION WITH BONE VOLUME AND OSTEOBLASTIC FUNCTION: A CROSS-SECTIONAL STUDY --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	OSIN-D-19-00384
Full Title:	BONE FRAGILITY IN PREMENOPAUSAL PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND ITS CORRELATION WITH BONE VOLUME AND OSTEOBLASTIC FUNCTION: A CROSS-SECTIONAL STUDY
Article Type:	Original Article
Funding Information:	
Abstract:	<p>ABSTRACT</p> <p>Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with an increased risk of fractures. Little is known about changes in bone histomorphometry (BH) in premenopausal women with T2DM. The aim of the present study is to evaluate BH in premenopausal women with T2DM, correlating it with the presence of vertebral fracture (VF), serum parathyroid hormone-related protein (PTHrP), IGF-1 levels and bone mineral density (BMD).</p> <p>Methods: This is a cross-sectional study where twenty-six premenopausal women who underwent to bone biopsy were divided into two groups, with and without VF. They were compared with two different controls groups: one historic (CG, n=15) for BH parameters, other comprised by young healthy women (HC, n=13), for BMD, PTHrP and IGF-1.</p> <p>Results: Prevalence of VF was 11.5% of the women with T2DM (3/26). Comparison between the groups with and without VF showed that thickness (O.Th) and osteoid surface (OS/BS) were lower in the VF group. Comparison between the groups with and without VF with CG showed static parameters of bone formation (O.Th, OS/BS) were lower in the VF group and the structural parameters (bone volume, BV/TV; trabecular number, Tb.N) were higher in the without VF group. In the comparison with HC, PTHrP and BMD were higher in women with T2DM.</p> <p>Conclusion: Premenopausal patients with T2DM present a high prevalence of morphometric spine fractures. Bone disease in T2DM appears to be a continuum in which the most severe endpoint is characterized by a reduction in the structural parameters in addition to a probable decrease of osteoblastic function. High BMD underestimates the risk of fractures in this population.</p>
Corresponding Author:	Vicente Florentino Castaldo Andrade, M.D. Universidade Federal do Paraná Curitiba, Paraná BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Paraná
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	vicente florentino castaldo andrade, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	vicente florentino castaldo andrade, M.D. Domingos C. Chula, MD Fábio P. Sabbag, PhD Daniel D. de S. Cavalcante, MD Lorena Bérta, PhD Alair Rogério Ambrósio, MSc

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

	Solena Kusma, PhD Luciene M. dos Reis, PhD Victória Z.C. Borba, MD, PhD Carolina de Aguiar Moreira, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	
Suggested Reviewers:	David W. Dempster, PhD Professor of Clinical Pathology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University ddempster9@aol.com Due to his expertise in the area of bone histomorphometry. Don Kimmel, MD Professor, Creighton University kimmeldb@comcast.net For his knowledge of bone biology and bone histomorphometry.

APÊNDICE 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC DA UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DOS DETERMINANTES DA QUALIDADE ÓSSEA EM PACIENTES DIABÉTICAS TIPO 2 EM ESTÁGIOS E GRAUS DIVERSOS DE CONTROLE DA DOENÇA

Pesquisador: VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55824516.3.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.646.120

Apresentação do Projeto:

Diabetes Mellitus e osteoporose são doenças de crescente prevalência com o envelhecimento da população e de morbidade e mortalidade significativa. As relações entre ambas é complexa e permanece controversa apesar de já extensamente estudadas, apontando risco de fratura em qualquer sítio esquelético por causa da pobre qualidade do osso. A avaliação da microestrutura óssea é instrumento importante na análise das propriedades mecânicas do osso e, conseqüentemente, do risco de fraturas por fragilidade. O exame considerado

padrão ouro para avaliação destes parâmetros é a histomorfometria, que é a análise quantitativa e qualitativa de uma biópsia óssea, a qual através de uma marcação prévia do tecido, possibilita a medida da formação óssea de uma maneira dinâmica. Há poucos estudos de histomorfometria óssea em DM, com apenas um estudo em DM1 e poucos em DM2.

O presente estudo tem por finalidade comparar parâmetros histomorfométricos, densidade mineral óssea, fraturas morfométricas, níveis de glicemia, hemoglobina glicada, cálcio, fósforo, PTH, 25-OH-vitamina D, cálcio urinário de 24hs, fosfatase alcalina, creatinina, esclerostina e medida do acúmulo sérico e ósseo de AGES (pentosidina sérica, pentosidina óssea, em pacientes diabéticos tipo 2 controlados e não controlados baseados na média da hemoglobina glicada (menor ou igual a 7% e maior do que 7%,

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

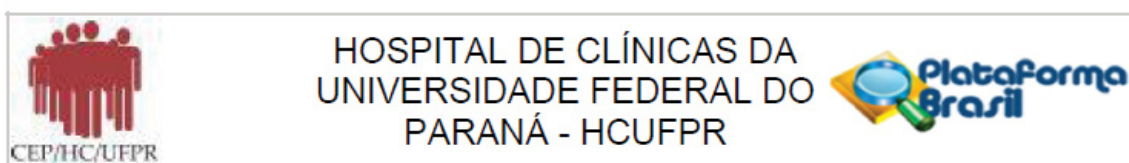
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.646.120

respectivamente) dos últimos 2 anos.

Serão avaliadas 40 mulheres com diagnóstico de DM2 atendidas nos ambulatórios do SEMPR com idade superior a 25 anos e inferior a 50 anos, sendo 20 delas que apresentem HbA1c menor que 7% e 20 com HbA1c maior ou igual a 7%, cada grupo sendo subdividido em subgrupos com pacientes com mais de 5 anos de doença e com menos de 5 anos de doença. Mulheres na pós-menopausa ou pacientes com outras causas secundárias de osteoporose ou que estejam usando qualquer medicação que interfira no metabolismo ósseo serão excluídas, bem como pacientes com nefropatia cujo clearance de creatinina seja inferior a 30 ml/ min/ 1,72 m² área corporal.

Será realizado um estudo transversal e observacional com pacientes portadores de DM2. Durante a consulta de rotina os pacientes serão convidados a participar da pesquisa. Aqueles que concordarem e preencherem os critérios de inclusão e não apresentarem os de exclusão terão seu prontuário revisado para coleta de dados clínicos (perfil sócio-demográfico; história do diabetes como tempo de doença, tipo de medicação em

uso; presença de complicações) e dados laboratoriais (glicemia, HbA1C, fosfatase alcalina, creatinina, 25-OH-vitamina D, cálcio sérico, fósforo inorgânico, PTH intacto, cálcio urinário (24hs. Serão coletados do prontuário dados do do último exame de densitometria óssea. Os pacientes serão divididos em 2 grupos de acordo com a média dos níveis da HbA1C dos últimos 5 anos. Os pacientes serão informados do procedimento de biópsia óssea, o qual será realizada no Hospital de Clínicas. Previamente ao procedimento, os pacientes deverão tomar tetraciclina 500 mg via oral de 12/12 horas por 3 dias, com pausa de 10 dias seguida de mais 3 dias de tetraciclina, com o objetivo de marcar o tecido ósseo para a leitura dinâmica na histomorfometria. No dia da biópsia, os pacientes deverão comparecer em jejum, todos receberão uma sedação com midazolam 5 mg IM

Objetivo da Pesquisa:

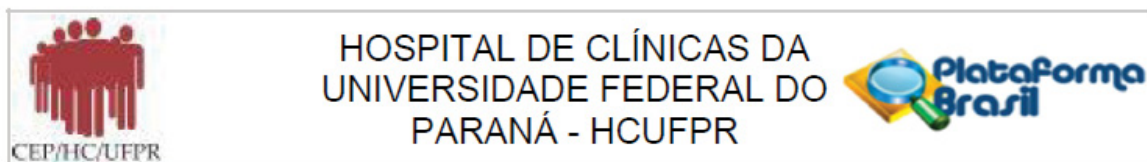
O presente estudo tem por finalidade comparar parâmetros histomorfométricos, densidade mineral óssea, presença de fraturas morfológicas, níveis de esclerostina e medida do acúmulo sérico e ósseo de AGES em pacientes diabéticas tipo 2 controlados e não controlados baseados na média da hemoglobina glicada dos últimos 2 anos, com mais 5 anos de doença e com menos de 5 anos de doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O maior risco para os pacientes envolvidos no estudo está relacionado à execução da biópsia óssea para coleta de material para realização do exame de histomorfometria. A histomorfometria consiste em um exame histológico de uma biópsia óssea transilíaca calcificada com o objetivo de

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.646.120

obter informação quantitativa sobre a remodelação e a estrutura óssea após marcação com tetraciclina que é administrada em dois turnos

separados por um intervalo sem a medicação. A crista ilíaca é o sítio preferido para biópsia óssea, sendo que o fragmento ideal deve conter as corticais interna e externa com osso trabecular entre elas. A biópsia óssea é um procedimento seguro, bem tolerado e as complicações graves são incomuns. Em uma grande série com 9.131 pacientes biopsiados, somente 64(0,7%) apresentaram alguma complicação, sendo hematoma e dor local os mais frequentes (RAO, MATKOVIC; DUNCAN, 1980).

Benefícios:

Definir métodos que identifiquem pacientes diabéticos com maior risco de fratura

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de proposta de tese de doutorado na pós graduação do Departamento de Clínica Médica, devidamente orientado por docentes profissionais especialistas. Estudo transversal observacional com aplicação de biópsia óssea como parte da metodologia, com riscos conhecidos e controlados, com grande potencial de contribuição ao conhecimento na área em população local.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE apresentado de forma adequada com previsão de guarda de material biológico o qual só será utilizado para outro estudo mediante novo consentimento. Os riscos da biópsia óssea que faz parte da metodologia foram explicitados.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência resolvida.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

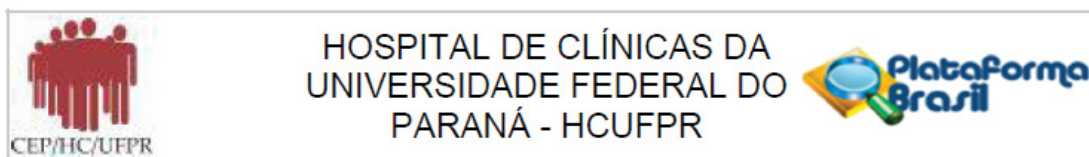
Telefone: (41)3360-1041

Município: CURITIBA

Fax: (41)3360-1041

CEP: 80.060-900

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.646.120

arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_685749.pdf	28/06/2016 18:08:06		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisadores.jpg	28/06/2016 18:05:07	VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2016 18:02:17	VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CEP.pdf	06/05/2016 10:28:59	VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPFINAL.docx	03/05/2016 17:04:25	VICENTE FLORENTINO CASTALDO ANDRADE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 24 de Julho de 2016

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

APÊNDICE 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO USADO NO ESTUDO



TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: “ESTUDO DOS DETERMINANTES DA QUALIDADE ÓSSEA EM PACIENTES DIABÉTICAS TIPO 2 EM ESTÁGIOS E GRAUS DIVERSOS DE CONTROLE DA DOENÇA”.

Investigador: Vicente Florentino Castaldo Andrade

Local da Pesquisa: Serviço de Endocrinologia e Metabologia (SEMPR), Hospital de Clínicas, UFPR.

Endereço e telefone: Rua Agostinho Leão Jr. 285, Alto da Glória, fone: 2141-1734, Curitiba – Paraná.

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO:

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado “pesquisador”. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

Você tem um tipo de doença denominado de "diabetes mellitus tipo 2" e está sendo convidado a participar de um estudo intitulado "Estudo dos determinantes da qualidade óssea em pacientes diabéticos tipo 2 em estágios e graus diversos de controle da doença". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) pode causar um risco aumentado de fraturas ósseas mesmo sem levar a osteoporose, pois a massa óssea medida pela densitometria óssea está de 6 a 7% acima da média das pessoas que não tem diabetes, ou seja, o DM2 é uma doença onde os ossos ficam frágeis e com risco aumentado de fraturas. O objetivo deste estudo é avaliar de que maneira o DM2 afeta o osso e causa esta fragilidade do esqueleto

SELEÇÃO

Os pacientes serão selecionados no ambulatório de Endocrinologia Geral e de Diabetes do Hospital de Clínicas da UFPR no período de 01 de julho de 2016 a 31 de julho de 2017.

Critérios de inclusão:

Mulheres na pré-menopausa, de 30 a 50 anos de idade, portadoras de DM2.

Critérios de exclusão:

Outras causas de osteoporose secundária como hiperparatireoidismo, hipertireoidismo, doença intestinal, imobilização e pacientes que não deambulam, doença hepática ou renal, diabetes mellitus tipo 1, uso de anticonvulsivante ou análogo de LHRH.

PROCEDIMENTOS

Caso você participe desta pesquisa, você deverá comparecer ao Hospital de Clínicas para uma consulta médica e para realização de alguns exames. Inicialmente, coleta de sangue (na veia do braço com agulha fina),

radiografia da coluna e densitometria óssea da coluna e do fêmur (exame realizado por uma máquina que mede a massa óssea, sem desconforto e com duração de aproximadamente 40 minutos).

Após avaliação dos resultados dos exames, você será chamado para retornar ao Hospital onde receberá informação sobre o procedimento da biópsia óssea. Vinte dias antes da biópsia, você será orientado a tomar tetraciclina 500mg via oral (pela boca) por 3 dias, parando 10 dias e voltando a tomar mais 3 dias, com a finalidade de fazer uma marcação no seu osso. Após este período, você estará pronto para ser submetido à biópsia óssea o qual será marcada com antecedência.

No dia da biópsia você deve comparecer ao Hospital de Clínicas, podendo se alimentar normalmente antes do procedimento. Em uma sala de procedimentos, você ficará deitado (com a barriga para cima) e inicialmente receberá 5 – 10 mg intramuscular de Dormonid, um remédio que a deixará mais relaxada e menos ansiosa com o procedimento, e também fará que você não se lembre da biópsia posteriormente. A biópsia será realizada no osso do quadril, após a aplicação de anestesia local. Um corte de aproximadamente 5 cm será realizado na pele, e através da introdução de uma cânula com bordos serrilhados até o seu osso, a biópsia será realizada. Após a retirada do material da biópsia (2-3cm), a pele cortada será suturada e um curativo compressivo será feito. Você deverá então permanecer deitada por mais ou menos 2 horas, e então poderá ir para casa. O procedimento da biópsia óssea é seguro e geralmente bem tolerado, podendo ficar doloroso e com um leve hematoma no local nas primeiras 24-48 horas. Complicações relacionadas com o procedimento são bastante raras, menos que 1% dos casos, como sangramento, infecção e formação de hematoma no local. O material da biópsia e as amostras de sangue que você coletará, e todos os exames que você fizer ficarão armazenados no Serviço de Endocrinologia da UFPR, onde serão avaliados. O mesmo só serão usados neste estudo, ou em outros estudos no futuro, baseado na sua autorização expressa neste documento.

O médico, Dr. Vicente Florentino Castaldo Andrade poderá ser contatado pelos telefones, 9613-2544 ou 2141-1734, ou no Hospital de Clínicas

(SEMPR) das 8 horas- 15 horas de segunda à sexta-feira, conforme consta no padrão ético vigente no Brasil.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados e discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS :

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe (nos horários, endereços e telefones citados acima). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para o mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito, neste ou em outros futuros estudos.

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento, e todos os riscos a que estou submetida. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL	ASSINATURA	DATA
(Se menor ou incapacitado)		
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA
(Pessoa que tomou o TCLE)		